VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN AM BARR-KÖRPERCHEN IN HAARWURZELZELLKERNEN NACH FÄRBUNG MIT QUINACRINE-DIHYDROCHLORID UND DIAMANTFUCHSIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
HARALD SPERLING
aus Leer/Ostfrsl.

Bonn 1979

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN AM BARR-KÖRPERCHEN IN HAARWURZELZELLKERNEN NACH FÄRBUNG MIT QUINACRINE-DIHYDROCHLORID UND DIAMANTFUCHSIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
HARALD SPERLING
aus Leer/Ostfrsl.

Bonn 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter : Prof. Dr. med. E. Schwinger

2. Gutachter : Prof. Dr. med. H. Weicker

Tag der mündlichen Prüfung : 18.9.1979

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn

Direktor : Prof. Dr. med. U. Heifer

Druck : Firma Heismann, Bonn,

Meiner lieben Frau

in Dankbarkeit

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1	Einleitung	7
1.1	Historisches über Heterochromatin und das Barr-Körperchen	7
1.1.1	Untersuchungen von HENKING,McCLUNG,STEVENS, WILSON und GUTHERZ	9
1.1.2	Untersuchungen von HEITZ	11
1.1.3	Untersuchungen von BARR und BERTRAM über das "Sex-Chromatin"	12
1.2	Sex-Chromatin in Metaphasen und Interphasen verschiedener tierischer und menschlicher Gewebe	13
1.3	Anwendungsgebiete der Geschlechtsbestimmung heute	14
1.4	Ziel der Arbeit	15
2	Vergleichende Untersuchung am Barr-Körperchen in Haarwurzelzellkernen nach Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid und Diamantfuchsin	
2.1	Material und Methode	16
2.1.1	Kollektiv,Entnahme und Präparation der Haarwurzelzellkerne	16
2.1.2	Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid	17
2.1.3	Photographische Darstellung des Barr-Körperchens mit dem Fluoreszenzmikroskop	17
	1. Übersichtsaufnahmen mit der Polaroidkamera	18
	2. Einzelaufnahmen der Zellkerne (100-fache Vergrößerung)	18
2.1.4	Entfärbung und Umfärbung der Haarwurzelzellkerne mit Diamantfuchsin	19
2.1.5	Photographie der umgefärbten Zellkerne im Lichtmikroskop	19
2.1.6	Auswertung	20

		Seite
2.2	Ergebnisse	25
2.2.1	Zellkernveränderungen nach der Umfärbung	25
2.2.2	Häufigkeit und Lage des Barr-Körperchens nach dem Umfärbeprozeß	26
2.2.3	Größen- und Strukturveränderungen des Barr-Körperchens nach Umfärbung mit Diamantfuchsin	27
2.2.4	Kern-Barr-Körperchen-Relation	28
2.2.5	Einschnürung und Zweiteilung des Barr-Körperchens nach der Umfärbung	30
3	Diskussion	31
3.1	Material und Methode	31
3.1.1	Haarentnahme	31
3.1.2	Präparation	33
3.1.3	Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid	34
3.1.4	Umfärbung	35
3.1.5	Photographie	36
3.2	Auswertung und Ergebnisse	38
3.2.1	Subjektivität der Beurteilung	38
3.2.2	Frequenz des Barr-Körperchens	39
3.2.3	Zellkerngröße	43
3.2.4	Lage und Größe des Barr-Körperchens	44
3.2.5	Struktur des Barr-Körperchens	44
4	Resumé	46
5	Zusammenfassung	47
6	Literaturverzeichnis	49
7	Lebenslauf	66

1 Einleitung

1.1 Historisches über Heterochromatin und das Barr-Körperchen

Seit der Jahrhundertwende wurden mit großem Interesse Untersuchungen an Chromosomen von Pflanzen und Tieren (Insekten) durchgeführt (HENKING 1892 ; McCLUNG 1901,1902).
Besondere Aufmerksamkeit galt dabei auch den Geschlechtschromosomen (Heterosomen),die hinsichtlich ihres Verhaltens während des Zellzyklus typische Besonderheiten aufweisen.Die Erforschung der Chromosomen,insbesondere der Geschlechtschromosomen und ihre Bedeutung ist bis heute nicht abgeschlossen.Es bedarf weiterer und verfeinerter Untersuchungsmethoden um die Struktur (SCHWARZACHER und SCHNEDL 1969),die genetische Aktivität,sowie das besondere Verhalten dieser Geschlechtschromosomen während der Meiose zu erklären.
Das Barr-Körperchen (nucleolar satellite,Sex-Chromatinkörperchen, Drumstick in Granulozyten oder Geschlechtschromatin) ist morphologisch definiert als ein mit Nucleinfarbstoffen (z.B. Feulgen, Thionin,Orcein,Diamantfuchsin,Atebrin) stärker anfärbbares,meist der Zellkernmembran anliegendes,ca. 1µ großes,dicht gepacktes Chromatinbröckchen der Interphase des Zellzyklus (BARR und BERTRAM 1949).Dieses Körperchen läßt sich heute in vielen tierischen und fast allen menschlichen Geweben (z.B.Wangenschleimhaut,Vaginal- und Urethralschleimhaut,peripheren Leukozyten,Haarwurzelzellen) und anderen Gewebearten zur Darstellung bringen.
Bei phänotypisch normalen Frauen findet man das Barr-Körperchen in Interphasezellkernen zu einem Prozentsatz von 30-80% vor.
Die Häufigkeit ist unter anderem abhängig von der Gewebsart (KLINGER 1957 b ; JAMES 1960 ; SCHWARZACHER 1963 ; THERKELSEN und LAMM 1966).Beim Mann kommt ein das Barr-Körperchen imitierendes DNS-Bröckchen in einer Häufigkeit von 1-3% vor (MOORE und BARR 1954).Dabei kann primär nicht immer eine Aussage über die Anzahl der Geschlechtschromosomen des betreffenden Individuums gemacht werden.

Es gilt als allgemein sicher,daß das sogenannte Barr-Körperchen (Sex-Chromatinkörperchen) in Interphasezellkernen dem fakultativ heterochromatischen,genetisch inaktiven X-Chromosom der Frau entspricht (HEIL 1970 ; SANDRITTER 1970 ; LYON 1970).Nach autoradiographischen Messungen repliziert das das Barr-Körperchen bildende X-Chromosom später als die übrigen Autosomen und das andere X-Chromosom (LIMA de FARIA 1959 ; TAYLOR 1960).
Das Barr-Körperchen ist im wesentlichen nur während der Interphase des Zellzyklus präferentiell anfärbbar und damit sichtbar. Während der Mitose verliert es seine Anfärbbarkeit (es wird unsichtbar) durch Dekondensation.Das heißt,daß dies eine X-Chromosom in entspiralisiertem Zustand vorliegt.Worauf der Mechanismus des unterschiedlichen Verhaltens der beiden X-Chromosomen beruht, ist bis heute nicht geklärt.
Außer dem Barr-Körperchen sind im Innern locker strukturierter Interphasezellkerne häufig auch andere,sich mehr oder weniger intensiv anfärbende Partikel zu beobachten,die als spezifische Chromozentren autosomalen Ursprungs anzusehen sind.Diese Strukturen dürfen bei der Beurteilung,ob ein Zellkern Barr-Körperchen-positiv oder -negativ ist,nicht berücksichtigt werden.
Barr-Körperchen werden in der Interphase meistens in peripherer Lage gesehen,d.h.,sie liegen mit einer Seite der Zellkernmembran an (KLINGER 1957 b ; MILES 1961 ; SCHWARZACHER 1963).Zu einem bestimmten Prozentsatz kann das Barr-Körperchen aber auch mehr in Richtung auf das Zellkerninnere,bzw. im Zentrum des Zellkerns beobachtet werden (KLINGER 1957 b).
Um eine Verwechslung mit autosomalen Chromatinstrukturen auszuschließen,werden heute nach allgemeingültiger Empfehlung nur Barr-Körperchen in peripherer Lage bei der Auswertung spezieller Untersuchungen berücksichtigt.In dieser Arbeit kamen deshalb auch nur solche Zellkerne zur Auswahl,die in der Quinacrine-Dihydrochloridfärbung ein eindeutig peripher gelegenes Barr-Körperchen zeigten.

Anhand einiger kurzer Darstellungen über die Entdeckung der Geschlechtschromosomen und des Geschlechtschromatins (Barr-Körperchen) sollen von den zahlreichen Forschern hier nur einige herausragende Persönlichkeiten angeführt werden.

1.1.1 Untersuchungen von HENKING,McCLUNG,STEVENS,WILSON und GUTHERZ

Kernbesonderheiten in den Geschlechtszellen waren bereits HENKING (1892) aufgefallen.Er fand in Zellkernen mit Chromatinfarbstoffen stark anfärbbare Strukturen,die er wegen ihrer häufig nachbarschaftlichen Lage zu einem Nukleolus als "Chromatinnukleolus" bezeichnete.Ferner beobachtete er,daß bei der zweiten Reifeteilung dieses Chromatinbröckchen ohne Teilung in eine der beiden Tochterzellen überging.Daraus schloß HENKING,daß es zwei Sorten von Spermatozoen geben müsse,nämlich solche mit einem "Chromatinnukleolus" und solche ohne.Diese Chromatinstruktur mußte nach HENKING zum Teil aus Chromosom und zum andern aus Nukleolus bestehen.Er nannte diese Struktur X-Chromosom,eine Bezeichnung,die bis heute für die weiblichen Chromosomen beibehalten wurde.

McCLUNG stellte in zwei Arbeiten (1901,1902) die Hypothese auf, daß es zwei unterschiedliche Spermatozoen geben müsse,die das Geschlecht männlich oder weiblich bestimmten,"wenn das Chromatin in den Zellkernen eine bedeutende Rolle bei der Vererbung spiele". Seine Vermutung ging dahin,daß die eine Hälfte der Spermien - die mit dem Heterochromosom - mit der Eizelle männliche,die ohne Heterochromosom weibliche Individuen ergeben müßte.

STEVENS konnte (1905 und 1906) die Hypothese von McCLUNG experimentell nachweisen.Seine Untersuchungen am Mehlwurm Tenebrio molitor ergaben,daß in der Meiose zwei Sorten von Spermien gebildet werden und zwar mit je 10 Chromosomen,wobei bei den männlichen Würmern ein Chromosom sehr klein erschien.

Zur gleichen Zeit machte WILSON (1905,1909,1911) an Somazellen von Insekten die Entdeckung,daß bei einem Geschlecht ein Chromosom mehr oder weniger vorhanden ist,oder,wenn in beiden Geschlechtern die gleiche Anzahl von Chromosomen zu finden ist, sich diese morphologisch in einem Chromosom voneinander unterscheiden.Also werden in der Meiose zwei Arten von Spermien gebildet - einmal mit und zum andern ohne X-Chromosom.Damit aber war wiederum McCLUNGs Hypothese unabhängig untermauert.
Ein weiterer Unterschied zwischen männlichem und weiblichem Chromosomensatz wurde von WILSON (1911) herausgefunden.Danach kommen bei bestimmten Insektenarten Weibchen mit zwei X-Chromosomen und Männchen mit einem X und einem morphologisch anders gearteten Chromosom vor.Dieses bezeichnete WILSON als Y-Chromosom.

Nach GUTHERZ(1907) unterscheiden sich die Heterochromosomen von den übrigen Autosomen durch eine Besonderheit und zwar die sogenannte Heteropyknose.Er verstand darunter eine "Abweichung betreffs des Konzentrationsgrades der chromatischen Substanz,und zwar stets im Sinne eines dichteren Baus".Dieser sogenante "Chromatinnucleolus" zeichnet sich durch einen "nucleolusartigen,d.h. scharf begrenzten,annähernd rundlichen Körper aus,der die färberischen resp. auch chemischen Reaktionen des Chromatins aufweist".Im Ruhekern "erhält ein Heterochromosom eine eigene Membran" und bildet damit einen kleinen "selbständigen Kern" im Zellkern.
Hinsichtlich einer Differenzierung zwischen dem echten Nukleolus und dem Heterochromatinnucleolus verwandte GUTHERZ spezielle Färbemethoden.Mit Methylgrün (0,5%) und Essigsäure (0,3%) beobachtete er in ca. 50% der Zellkerne von Insektengeschlechtsdrüsen "ein leuchtend grün gefärbten,der Kernmembran dicht angeschmiegten Chromatinnucleolus,während der echte Nucleolus ungefärbt blieb oder eine sehr blasse Färbung annahm".In normalen männlichen somatischen Mitosen fand sich kein dem "Nucleoluschromatin" vergleichbares Element.Damit war eine eindeutige Identifikation von männlichen und weiblichen Individuen einer Gattung möglich geworden.

1.1.2 Untersuchungen von HEITZ

HEITZ führte in den Jahren 1933 und 1934 interessante Untersuchungen an den Geschlechtschromosomen von Drosophila melanogaster und Drosophila funebris durch.Danach sind in der Metaphase am X-Chromosom "Einschnürungen" zu sehen,die auch an anderen Chromosomen festgestellt wurden.Der kürzere Arm des Y-Chromosoms besteht zum Beispiel aus zwei Segmenten und zeigt sich in der Metaphase als sogenanntes "Trabantenchromosom".
HEITZ entwickelt in seinen Arbeiten Vorstellungen über die Bedeutung von Eu- und Heterochromatin.Außerdem wird zum ersten Mal die Möglichkeit diskutiert,daß es zwei morphologische Zustände des Chromatins geben könne : "Euchromatin ist genisch (= genetisch) aktiv(MÜLLER und SETTLES 1926 ; MÜLLER und PAINTER 1932),Heterochromatin genisch passiv.Heterochromatische Chromosomen oder auch Chromosomenstücke enthalten keine oder in irgendeiner Weise passive Gene",denn,so HEITZ weiter,"in der euchromatischen Hälfte liegen 46,in der heterochromatischen 9 Gene",obwohl trotzdem "der heterochromatische,passive Abschnitt des X-Chromosoms durchaus aktive Gene enthält".
Das X-Chromosom ist also in eu- und heterochromatische Abschnitte gegliedert.Es besitzt in der Metaphase eine auffallende Längsdifferenzierung,denn nur die eine Hälfte ist euchromatisch,die andere dagegen,in welcher die Einschnürung liegt,heterochromatisch. In allen drei Metaphasen nimmt das Euchromatin den distalen,das Heterochromatin den proximalen Teil des Chromosoms ein.In einer Anmerkung dazu schreibt HEITZ : "Ob dieses Euchromatischbleiben der distalen Hälfte des X-Chromosoms nur ein Zufall ist,oder ob tatsächlich das Euchromatin des X-Chromosoms sich langsamer nach dem kompakten metaphasischen Zustand hinentwickelt,ist eine weitere Frage....Tatsächlich drängt sich hier wiederum die Vermutung von der Existenz zweierlei Euchromatins auf".
Über die Heteropyknose der Chromosomen macht HEITZ (1933) folgende Feststellungen : "Die Heteropyknose erstreckt sich nicht auf das gesamte Chromosom (X oder Y),sondern bestimmte Abschnitte sind nicht heteropyknotisch.Diese Erscheinung wurde

als partielle Heterochromatie (= Heteropyknose) der totalen gegenübergestellt.Die partielle Heterochromatie findet sich nicht nur bei den Geschlechtschromosomen,sondern auch bei den Autosomen".Die Heteropyknose in der Pro- und Telophase und im ruhenden Zellkern tritt in somatischen Zellen beider Geschlechter auf.Schlußfolgerung aus diesen Untersuchungen war die Feststellung,daß auch bei Tieren eine partielle Heteropyknose zu finden ist: Bei männlichen Individuen ist ein Geschlechtschromosom stets total heterochromatisch,das andere Chromosom verhält sich nur vom proximalen Ende bis zur Mitte hin heterochromatisch,von da bis zum distalen Ende hin euchromatisch.

1.1.3 Untersuchungen von BARR und BERTRAM über das "Sex-Chromatin"

Die Arbeiten von BARR und BERTRAM (1949),BARR et al.(1950), brachten eine Reihe von neuen Erkenntnissen in der Chromosomenforschung,speziell über das X-Chromosom.In Untersuchungsreihen an Nervengewebe verschiedener Lokalisation von Katern und Katzen konnten nach Färbung mit Kresyl-Violett stärker angefärbte Strukturen im Zellkern gesehen werden.Diese stärker gefärbten Abschnitte wurden als "nucleolar satellites" bezeichnet.Sie lagen seltener im Zellkerninnern,meistens dem Nukleolus oder der Zellkernmembran an."Liegt dieses Körperchen (body) an der Kernmembran,so hat es eine dreieckige Form bei einem Durchmesser von ca. 1µ .Mit basischen Farbstoffen ist es mehr oder weniger anfärbbar".Einzelheiten innerhalb des "nucleolar satellite" konnten von den Untersuchern aber nicht gesehen werden.
Bei Katern wurde diese Struktur im Zellkerninnern nur zu einem geringen Prozentsatz gefunden (3-5%).Außerdem war dieses "body" kleiner als bei der Katze.
Nach Färbung mit Thionin fiel der Prozentsatz an "nucleolar satellites" noch höher aus.In 72% der Fälle lagen sie der Zellkernmembran dicht an,selten nur im freien Kernplasma.
Mit der Feulgen-Färbung konnte eine Differenzierung zwischen Nukleolen und den sogenannten "nucleolar satellites" gemacht

werden.Letzterer erwies sich als Feulgen-positiv.Aus dieser spezifischen Anfärbbarkeit der Zellkernstrukturen schlossen BARR und BERTRAM (1950),daß der "nucleolar satellite" Desoxyribonukleinsäure (DNS),der Nukleolus Ribonukleinsäure (RNS) enthalten müsse.
Untersuchungen an menschlichen sympatischen Ganglienzellen bestätigten die Ergebnisse und Vermutungen,die an den Katzen und Katern gewonnen worden waren.
Da das "body" in peripherer Lage häufig in weiblichen Zellen, selten in männlichen gesehen werden konnte,kamen BARR und BERTRAM zu dem Schluß,daß der "nucleolar satellite" ein Produkt der X-Chromosomen sein könne.

Mit diesen Entdeckungen war eine Zäsur in der Chromosomenforschung eingetreten.Nachdem es möglich geworden war,Chromosomen im Lichtmikroskop zu identifizieren und insbesondere weibliche von männlichen Individuen anhand von morphologischen und färbetechnischen Besonderheiten der Chromosomen zu erkennen,galt nunmehr großes Interesse dem Feinbau der genetischen Substanz. Bis heute gibt es jedoch nur vage Vorstellungen und Theorien über Bau und Funktionsmechanismus der Erbsubstanz (SCHWARZACHER 1969).

1.2 Sex-Chromatin in Metaphasen und Interphasezellkernen verschiedener tierischer und menschlicher Gewebe

Nach der Darstellung und Beschreibung des sogenannten "nucleolar satellite"durch BARR und BERTRAM (1949 und 1950),bezeichnete man diese sich mit basischen Farbstoffen anfärbbaren Chromatinbröckchen als Sex-Chromatin oder auch Barr-Körperchen.Es hatte sich herausgestellt,daß keine unmittelbare Beziehung zu den Nukleolen im Zellkern bestand.
GRAHAM und BARR zeigten 1952 ,daß das Sex-Chromatin nicht nur in Nervenzellen gesehen werden konnte.Barr-Körperchen wurden unter anderem in Herzmuskelzellen,Haut,Tumoren,Knorpel,Magenschleimhaut,Pankreas,Leber,Schilddrüse,Cortex,Niere,Uterusepithel,Interstitiumzellen von Hoden,Ovar,Prostata,Blutzellen und

Haarwurzelzellkernen nachgewiesen (DAVIDSON und SMITH 1954 ; MARBERGER et al. 1955 ; MOORE und BARR 1955 ; de MARS 1962 ; MITTWOCH 1963 ; SCHNEDL 1964 ; CARPENTIER 1966 ; BARLOW und VOSA 1970 ; ENGEL et al. 1970 b ;KATZ und WRIGHT 1970 ; KOCH 1970 ; GODAY et al. 1971 ; GREENSHER et al. 1971 ; SPERLING 1971 ; HAGY und BRODRICK 1972).

1.3 Anwendungsbereiche der Geschlechtsbestimmung heute

Die Tatsache,daß sich heute mit den Farbstoffen der Atebringruppe sowohl das Y-Fluoreszenzkörperchen (PEARSON 1970 ; PEARSON et al. 1970 ; MAJEWSKI et al. 1971 ; MENDE und ALONSO 1971 ; POLANI und MUTTON 1971 ; ROOK et al. 1971 ; SCHWINGER et al. 1971 ; THERKELSEN und PETERSEN 1971 ; THULINE 1971) als auch das Barr-Körperchen (KLINGER und LUDWIG 1957 a ; KLINGER 1957 b ; CASPERSSON et al. 1970 b,c ; CASPERSSON 1971 ; MUKHERJEE et al. 1972) in der Interphase darstellen lassen,hat der klinischen Diagnostik ein breites Anwendungsgebiet eröffnet.So werden relativ einfach auszuführende Voruntersuchungen beim TURNER- und KLINEFELTER -Syndrom (HARNDEN 1961) anhand von Interphasezellkernen der Wangenschleimhaut,der Amnionflüssigkeit und von Zellen der äußeren Haarwurzelscheide durchgeführt.Erst nach diesen Untersuchungen werden im Zweifelsfall Karyogramme,das heißt, Chromosomenkarten erstellt.Bei der Vielzahl an genetischen Defekten (z.B. Stückverluste von Chromosomen,Translokationen oder überzählige Chromosomen),besonders was die Geschlechtschromosomen anbelangt,lassen sich heute in Reihenuntersuchungen bestimmte Anomalien einer schnellen und exakten Diagnose zuführen (WALKER et al. 1971 ; DEGENHARDT und GEISLER 1972).
Die Geschlechtsbestimmung eines Foeten,sowie überzählige Chromosomen (z.B. beim Mongoloismus) lassen sich aus Zellen,die durch Amniozentese gewonnen wurden,leicht feststellen.Die Untersuchung läßt sich bei hoher Sicherheitsquote und geringem Risiko praktizieren (MUKHERJEE et al. 1972).

Heute sind nicht nur die Geschlechtsbestimmung aus Interphasezellkernen und die Diagnose bestimmter Chromosomenanomalien aus Mitosen möglich ; es wird versucht,anhand von autoradiographischen Markierungen von Chromosomen und Unterschieden in ihren Bandenmustern in verschiedenen speziellen Färbungen Erberkrankungen mit bestimmten Musterveränderungen zu erkennen.Hier wird in der Zukunft der modernen Cytogenetik ein breites Forschungsgebiet eröffnet.

1.4 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit sollte zeigen,daß sich in Haarwurzelzellkernen normaler weiblicher Individuen das sogenannte Barr-Körperchen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Quinacrine-Dihydrochlorid in der Interphase des Zellzyklus zur Darstellung bringen läßt.
Ferner wurde versucht eine Antwort auf die folgenden Fragen zu geben :

1) Sind in der Vergleichsfärbung mit dem klassischen DNS-Farbstoff Diamantfuchsin Unterschiede in der Zellkerngröße zu beobachten?
2) Färben sich in der Vergleichsfärbung (Diamantfuchsin) identische heterochromatische Strukturen (Barr-Körperchen) an?
3) Unterscheidet sich das Barr-Körperchen nach beiden Färbungen hinsichtlich seiner Lage im Zellkern?
4) Besteht ein struktureller Unterschied des Barr-Körperchens nach beiden Färbungen?
5) Korrelieren Zellkerngröße und Größe des Barr-Körperchens miteinander?

2 Vergleichende Untersuchung am Barr-Körperchen in Haarwurzelzellkernen nach Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid und Diamantfuchsin

2.1 Material und Methode

2.1.1 Kollektiv,Entnahme und Präparation der Haarwurzelzellkerne.

Es wurden frische Haare von 16 phänotypisch normalen Frauen entnommen (Siehe Abb 1).Die Wahl der Probandinnen erfolgte zufällig. Das Alter der untersuchten Frauen schwankte zwischen 18 und 30 Jahren.In einem Fall konnten die Haarwurzelzellen zwar präpariert und mit Quinacrine-Dihydrochlorid eingefärbt werden ; vermutlich durch mechanische Beschädigung der Präparate waren die entsprechenden Zellkerne nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin nicht mehr aufzufinden.Aus diesem Grund konnte bei Fall 13 keine vergleichende Untersuchung angestellt werden.
Bei der Haarentnahme wurde nach der unter anderem von SCHWINGER et al.(1971) empfohlenen Methode vorgegangen.
Zur Fixierung wurden die Haarbulbi für drei bis fünf Minuten in 25%-ige Essigsäure getaucht.Im Bedarfsfall wurde nochmals nachfixiert.Schon makroskopisch erkennt man die ausreichende Quellung der Haarwurzel an einer weißlichen,etwas schleimigen Verdickung.Diese Verquellung ist meistens zusätzlich ein Zeichen einer ausreichenden Fixation.
Die Präparation der Haarwurzeln wurde folgendermaßen vorgenommen: Nach Fixierung in 25%-iger Essigsäure wurden die Haare bis auf eine Länge von ungefähr drei Zentimetern abgeschnitten und vorsichtig unter leichtem Druck in Querrichtung auf einen mit Alkohol gereinigten Objektträger ausgestrichen (SCHWINGER et al. 1971).
Nach Lufttrocknung der Präparate,die ungefähr eine Minute dauert, wurde unter dem Lichtmikroskop bei mittlerer Vergrößerung und relativ starker Abblendung nachgeprüft,ob eine für die Auswertung hinreichende Zahl an Zellbahnen erreicht worden war.

Im Zweifelsfall wurden sonst noch einmal Haare gezupft und präpariert.

2.1.2 Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid

Zur Färbung wurden die trockenen Objektträger auf einer horizontalen Färbebank mit einer 0,5%-igen wäßrigen Lösung von Quinacrine-Dihydrochlorid (Bender & Hobein,Zürich ; Edward Gurr, London) beschichtet.Die Färbedauer betrug ca. 3-5 Minuten. Danach wurden die Präparate in stehendem Leitungswasser für ungefähr fünf Minuten gewässert und anschließend luftgetrocknet. Zur Auswertung der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop, wurden die Objektträger mit Phosphatpuffer pH 7 eingedeckt.

2.1.3 Photographische Darstellung des Barr-Körperchens mit dem Fluoreszenzmikroskop

Als Mikroskop fand ein Zeiß Universal-Auflicht-Fluoreszenzmikroskop mit Polaroid- sowie einem Kleinbildphotographieraufsatz Verwendung.Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampflampe HBO 200.Außerdem wurde mit den Erregerfilterkombinationen KP 500 und FL 435 sowie dem Sperrfilter,Kantenlänge 500 Nanometer,gearbeitet.Die Übersichtsaufnahmen der Zellkerne wurden mit Polaroid-Filmen,die Kleinbildaufnahmen mit ILFORD FP 4, 22 DIN photographiert.Die Polaroidaufnahmen wurden 70-90 sec, die ILFORD-Filme ca. 30-40 sec belichtet.Die Normallichtaufnahmen wurden mit AGEPAN-Filmen aufgenommen und 20-25 sec belichtet.

1. Übersichtsaufnahmen mit der Polaroidkamera
Hierbei wurde folgendermaßen vorgegangen :
Bei mittlerer Vergrößerung (Objektvergrößerung 75-fach),wurden im Durchlicht/Auflicht die am Objektträger haftenden Zellbahnen aufgesucht.Für die weiteren Untersuchungen wurden Zellkernbezirke ausgewählt,die nur geringe Schleierbildung durch das zerstörte Cytoplasma aufwiesen und solche Zellbahnen,die nur spärlich mit Kernen besetzt waren.Nach der Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid wurden jeweils bestimmte Zellbahnausschnitte mit der Polaroidkamera aufgenommen.Auf jedem der Übersichtsphotos konnte man ungefähr 50-100 Zellkerne zählen.Die Kontrolle für eine gute Ausbeute an Sex-Chromatinpositiven Zellkernen erfolgte durch Stichproben mit Hilfe der 100-fachen Vergrößerung (Ölimmersion).
2. Einzelaufnahmen der Zellkerne (100-fache Vergrößerung)
Anhand der Polaroidaufnahmen wurden alle Zellen des entsprechenden Ausschnittes der Zellbahnen auf das Vorhandensein eines Barr-Körperchens hin untersucht.Nur relativ aufgelockerte Zellkerne mit gut sichtbaren Strukturen und einem eindeutig peripheren Barr-Körperchen (MILES 1961) kamen für die weitere vergleichende Untersuchung zur Auswahl.Ungefähr 10-20% der auf den Polaroidbildern festgehaltenen Zellkerne eigneten sich aufgrund der photographisch gut darstellbaren Barr-Körperchen zu vergleichenden Betrachtungen nach der Umfärbung.Das heißt,daß bei einer Durchschnittszellzahl von 50 Kernen pro Polaroidaufnahme ca. 5-10 Zellkerne abphotographiert werden konnten,die ein optisch eindeutig identifizierbares Barr-Körperchen enthielten.
Die Lage des Barr-Körperchens im Zellkern wurde bei Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop schriftlich festgehalten.Anschließend wurden von den Filmnegativen Positivabzüge hergestellt,um eine bessere Aussage über Lage und Struktur des Barr-Körperchens machen zu können.
Um das Wiederauffinden derselben Zellen nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin zu erleichtern,wurden die photographierten Zellkerne auf den Polaroid-Übersichtsaufnahmen markiert und die Koordinaten ihrer Positionen anhand des Nonius am Mikroskop schriftlich festgehalten (100-fache Vergrößerung).

2.1.4 Entfärbung und Umfärbung der Haarwurzelzellkerne mit Diamantfuchsin

Nach der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung und Photographie von pro Fall ca. 7-44 Aufnahmen (Zellkernen)(Abb 1),wurden die Objektträger abgedeckt und in 75%-igem Alkohol gespült und anschließend für fünf Minuten in stehendes Leitungswasser gegeben. Danach erfolgte für acht Minuten Hydrolyse in 1N HCl in einem Wasserbad einer Temperatur von genau 60° Celsius.Die Präparate wurden unmittelbar danach in 0,1 prozentiger,wäßriger Lösung von Diamantfuchsin (Merck 1356) für sieben bis zehn Sekunden gefärbt,die überstehenden Farbreste unter fließendendem Wasser abgespült,die Objektträger dann bei Raumtemperatur staubfrei luftgetrocknet.Schließlich wurden die Präparate unter einem Deckglas in Eukitt eingedeckt.

2.1.5 Photographie der umgefärbten Zellkerne im Lichtmikroskop

Die vorher unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewählten und photographierten Zellkerne wurden danach mittels der Noniuseinstellung am Mikroskop sowie der Polaroid-Übersichtsaufnahmen und der schriftlichen Aufzeichnungen (Beschreibung der Zellform ; Lage des Barr-Körperchens) erneut aufgesucht,identifiziert und bei gleicher Vergrößerung (100-fach) im Normallicht aufgenommen.Zusätzlich wurde die genaue Lage des Barr-Körperchens im Zellkern nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin festgehalten.Soweit die umgefärbten Zellkerne ein gut kontrastiertes Barr-Körperchen enthielten,wurden die Zellen bei mässig abgeblendetem Licht und bei einer Belichtungszeit von ca. 20-25 sec erneut abphotographiert.

2.1.6 Auswertung

Insgesamt wurden aus einem weitaus größeren Kollektiv an Zellkernen 287 in der Quinacrine-Dihydrochloridfärbung und 236 Zellen in der Diamantfuchsinfärbung photographiert.Aus beiden Färbungen kamen dann insgesamt je 180 Zellkerne für die vergleichende Untersuchung zur Auswahl (Siehe Abb 1). Die Auswertung hinsichtlich der Größe des Zellkerns nach beiden Färbungen sowie der Lage und Größe des Barr-Körperchens erfolgte anhand von drei Untersuchungsgängen :

1. Vergleich der mit Quinacrine-Dihydrochlorid gefärbten Zellkernbilder (Positivabzüge) und Betrachtung der mit Diamantfuchsin gefärbten Kerne nach der schriftlich festgehaltenen Position im Lichtmikroskop.Hier wurde keine Aussage über Größenunterschiede des Barr-Körperchens in beiden Färbungen gemacht.Strukturbesonderheiten (Zweiteilung,Einschnürung,Randstruktur) wurden schriftlich für jeden Zellkern nach der Umfärbung festgehalten,das heißt,Veränderungen am Barr-Körperchen wurden beschrieben.
2. Vergleichende Betrachtung der Positivabzüge nach gleicher Vergrößerung vom Filmnegativ (Abb 2).
3.Übereinanderprojektion der Filmnegative auf weißes Papier mit einem Vergrößerungsapparat (Spektren-Auswertegerät 118 u, Firma R. Fuess,Berlin-Steglitz,Vergrößerung 20-fach) (Abb 3).

Zunächst wurde das Filmnegativ des photographierten Zellkerns in der Fluoreszenzfärbung auf den Meßtisch projiziert.Auf einem weißen Blatt Papier wurden dann jeweils der Zellkern in seinen Umrissen,das Barr-Körperchen und andere auffällige, stärker angefärbte Strukturen im Zellkern mit einem Bleistift nachgezeichnet.Der gleiche Vorgang wurde für das Filmnegativ der Diamantfuchsinfärbung wiederholt (Abb 4).Außerdem wurden die größten Durchmesser der Zellkerne (in Abb 4 =(d)eingezeichnet.Unterschiede in der Größe des Barr-Körperchens wurden nach den Umrißzeichnungen in beiden Färbungen festgehalten (Abb 4).

Fall Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Summe
Bilder in Fluoreszenz-färbung	20	7	10	10	10	12	10	10	12	10	10	12	34	36	44	40	287
Bilder in Diamantfuchsin-färbung	12	7	10	10	10	12	10	10	11	8	10	8	0	36	44	38	236
Davon verwert-bar	11	4	10	3	3	9	7	3	11	3	4	8	0	26	43	36	180

Abb 1

Die Abbildung zeigt,wieviel Einzelaufnahmen in jeder Färbung hergestellt wurden und wieviel Bilder pro Fall zur vergleichenden Untersuchung verwertet werden konnten.Bei Fall Nr. 13 war ein Vergleich in beiden Färbungen nicht möglich,da nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin die identischen Zellkerne nicht mehr aufgefunden werden konnten.

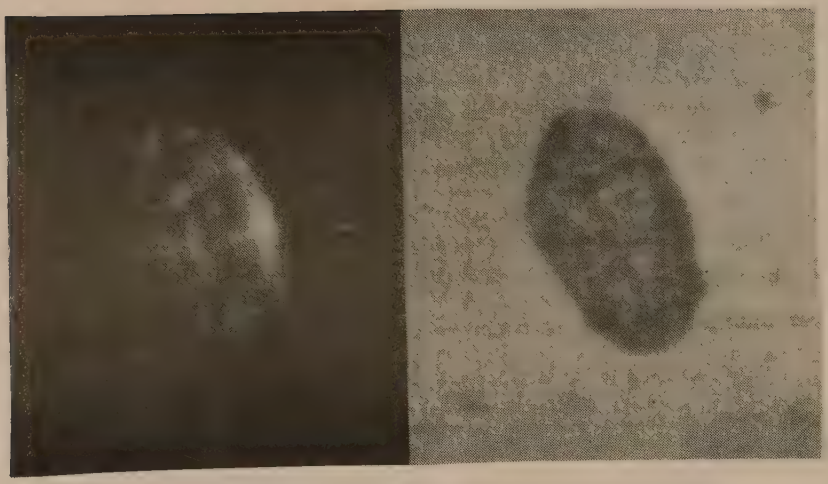

Abb 2

Positivabzüge eines Zellkerns der äußeren Haarwurzelscheide nach Quinacrine-Dihydrochloridfärbung (links) und nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin (rechts).Deutlich ist die schärfere äußere Begrenzung des Barr-Körperchens im Bild rechts (bei 11 Uhr) zu erkennen.Außerdem kömmt in dem Bild rechts eine ausgeprägte herzförmige Einschnürung des Barr-Körperchens zur Darstellung.In der Aufnahme nach Fluoreszenzfärbung ist diese Einschnürung durch den "Überstrahlungseffekt"nicht zu erkennen.Das Barr-Körperchen imponiert hier halbmondförmig.

(Vergrößerung ca. 2.500-fach)

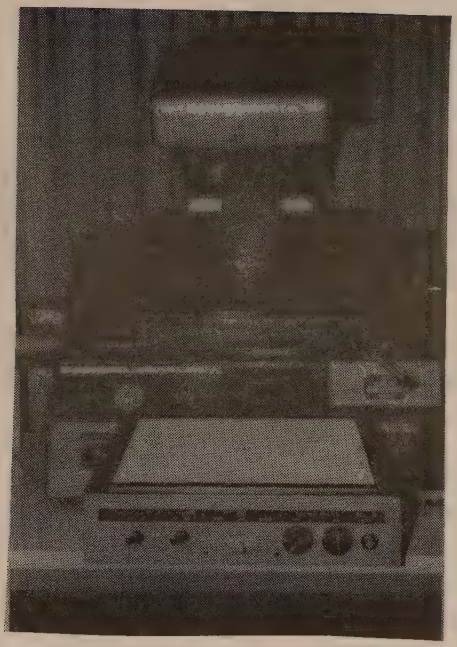

Abb 3

Vergrößerungsapparat (Spektren-Auswertegerät). Die Filmnegative wurden in den beweglichen Filmhalter in der Mitte des Bildes eingespannt.Mit einer Spiegeloptik (im Bild oben) wurden die Negativbilder der Haarwurzelzellkerne auf den Meßtisch (unten) projiziert.Danach wurden die Kernumrisse sowie die Barr-Körperchen in beiden Färbungen nachgezeichnet (Siehe auch Abb 4).

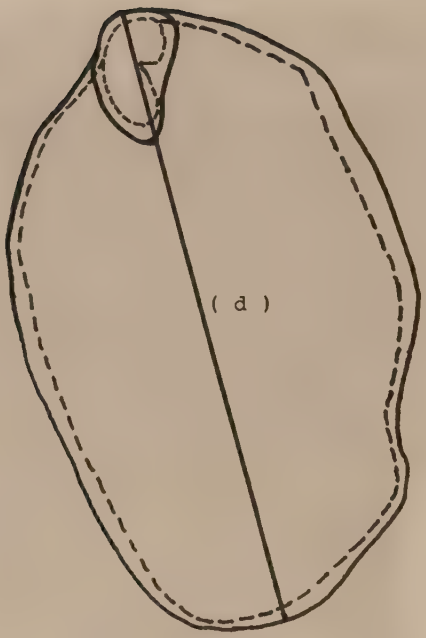

Abb 4

Umrißzeichnung eines Zellkerns mit Hilfe des Vergrößerungsapparates nach Übereinanderprojektion der Filmnegative in beiden Färbungen.Die durchgezogene Linie zeigt den Zellkern- und Barr-Körperchenumriß nach der Fluoreszenzfärbung.Die gestrichelte Linie stellt die Umrisse nach Färbung mit Diamantfuchsin dar. Zusätzlich ist der größte Zellkerndurchmesser (d) eingezeichnet.Ein struktureller Unterschied des Barr-Körperchens nach beiden Färbungen ergibt anhand der Skizze (halbmondförmig bzw. herzförmig).(Umrißzeichnung des in Abb 2 photographierten Zellkerns.Der Verkleinerungsmaßstab gegenüber der Originalumrißskizze beträgt 2 : 1).

2.2 Ergebnisse (SPERLING und SCHWINGER 1973)

2.2.1 Zellkernveränderungen nach der Umfärbung

Von den 287 Fluoreszenz- und den 236 Normallichtbildern wurden 180 Zellkerne für die weitere vergleichende Untersuchung ausgewählt (Siehe Abb 1).
Zuerst wurde die Zellkerngröße nach beiden Färbungen verglichen. An den Positivabzügen fiel häufiger auf,daß bei gleicher photographischer Vergrößerung der Abstand der einzelnen Zellen zueinander unterschiedlich weit war.Nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin imponierte der Abstand von einer Zelle zur anderen grösser als nach Quinacrine-Dihydrochloridfärbung.Auf diese Feststellung wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen nicht weiter eingegangen.Als Meßgrundlage für die Kerngrößenbestimmung wurden die Projektionen der mit Quinacrine-Dihydrochlorid gefärbten Zellkerne genommen,da sie oft größer imponierten als nach der Umfärbung.Von jeder Zelle wurde der größte Längsdurchmesser in Zentimetern bestimmt (Siehe Abb 4 (d)).Danach ergaben sich große,mittlere und kleine Haarwurzelzellkerne (Siehe Abb 5).

Kern	Anzahl	Prozent
größer 12 cm	36	20
9 - 12 cm	127	70,5
kleiner 9 cm	17	9,5
Summe	180	100,0

Abb 5

Die Vermessung der Zellkerne wurde auch deshalb durchgeführt,um eine Aussage darüber machen zu können,ob in relativ großen Zellkernen auch verhältnismäßig mehr große Barr-Körperchen gefunden werden und umgekehrt (Siehe auch Abb 8).

Die Zellkerngröße differierte nach den beiden Färbungen häufiger (Siehe Abb 4).So wurden von den 180 Zellkernen (= 100%), 23 (= 13%) mit stärkerer und 115 (= 64%) mit geringgradiger Verkleinerung gefunden.Bei 42 Zellkernen (= 23%) war nach der Übereinanderprojektion kein Größenunterschied festzustellen (Siehe Abb 6).
Die Zellkernumrisse imponierten nach Färbung mit Diamantfuchsin meist wesentlich schärfer als nach Quinacrine-Dihydrochlorid. Auch stellten sich andere anfärbbare Strukturen im Innern der Zellkerne nach Diamantfuchsinfärbung oft viel deutlicher dar (Siehe Abb 2); in der Quinacrine-Dihydrochloridfärbung schienen diese Strukturen hingegen oft ineinander zu fließen und erschwerten dadurch die eindeutige Beurteilung hinsichtlich der flächenmäßigen Ausdehnung von Kernen und insbesondere von Barr-Körperchen.

2.2.2 Häufigkeit und Lage des Barr-Körperchens im Zellkern nach dem Umfärbeprozeß

1) Die Häufigkeit der Sex-Chromatin-positiven Zellkerne nach Quinacrine-Dihydrochloridfärbung deckte sich im wesentlichen mit den von anderen Autoren beschriebenen Prozentzahlen (SCHMID 1967 ; GREENSHER et al. 1971 ; MUKHERJEE et al. 1972). Die Häufigkeit des Barr-Körperchens in der Färbung mit Diamantfuchsin wurde nicht ermittelt,da in allen 180 ausgewählten Zellkernen ein eindeutiges Geschlechtschromatinbröckelchen zu erkennen war.
2) Die Lage des Barr-Körperchens im Zellkern variierte nur geringfügig nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin.In 161 (= 90%) der 180 durchmusterten Zellkerne stimmte die Lage des Barr-Körperchens mit der nach Quinacrine-Dihydrochloridfärbung überein,in 16 (= 8,5%) wurde eine geringe Verlagerung,in 3 (=1,5%) eine so eindeutige Lageabweichung beobachtet,daß es sich in den übereinanderprojizierten Filmnegativen nicht zur Deckung bringen ließ.In 7% der photographierten Zellkerne schien der nach Fluoreszenzfärbung beobachtete innige Kontakt einer Seite des Barr-Körperchens mit der Zellkernmembran teilweise oder ganz aufgehoben.

2.2.3 Größen- und Strukturänderungen des Barr-Körperchens nach Umfärbung mit Diamantfuchsin

1) Nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin ergab sich bei 43 (=24%) von 180 Zellkernen eine Verkleinerung der Fläche des Barr-Körperchens,bei 8 (=4,5%) eine Vergrößerung ; 120 (=67%) der Zellkerne zeigten flächenmäßig ein gleich großes Barr-Körperchen. Auch der größte Durchmesser des Barr-Körperchens spiegelte in etwa die gleichen Prozentzahlen wider (Siehe Abb 6).

Barr-Körperchen	Zahl der Zellkerne	%
circa gleich	120	67
kleiner	43	24
größer	8	4
Keine Aussage möglich	9	5
Summe	180	100

Abb 6
Größe des Barr-Körperchens nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin

Die Form des Barr-Körperchens nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin zeigte,daß ein Großteil (78 Zellkerne = 43,3%)eine feine, unregelmäßige äußere Begrenzung besaß.In der Quinacrine-Dihydrochloridfärbung hingegen erschienen die Barr-Körperchen zu fast 98% mehr rund bis oval oder aber auch viereckig (KLINGER 1957 b). Scharf begrenzte Sex-Chromatinkörperchen konnten in der Quinacrine-Dihydrochloridfärbung nur in 2,2% der untersuchten Zellkerne beobachtet werden (Siehe Abb 7).

Form des Barr-Körperchens	rund	oval bis viereckig	unregelmäßige Randstruktur
Quinacrine-färbung	35 (19,5%)	141 (78,3%)	4 (2,2%)
Diamantfuchsin-färbung	15 (8,3%)	87 (48,4%)	78 (43,3%)

Abb 7

Die Form des Barr-Körperchens nach beiden Färbungen

2.2.4 Kern-Barr-Körperchen-Relation

Es wurde versucht,die Frage zu beantworten,ob in großen Zellkernen auch prozentual mehr große Barr-Körperchen gesehen werden konnten als in mittelgroßen und kleinen Kernen und umgekehrt (Siehe Abb 8).
Die Frage,ob in kleinen Zellkernen das Barr-Körperchen auch verkleinert erschien,konnte für 7 Zellkerne von insgesamt 23 nach Diamantfuchsinfärbung stärker verkleinerten Zellen mit einem ja beantwortet werden; in 12 Kernen waren die Barr-Körperchen gleich groß,in zwei Fällen größer.Zwei Zellkerne liessen keine eindeutige Aussage zu (Abb 9).

	großes	mittleres	kleines Barr-Körperchen
Kern größer 12 cm	16 (44,5%)	20 (55,5%)	0
Kern 9-12 cm	43 (34,0%)	81 (63,0%)	3 (2%)
Kern kleiner 9 cm	4 (23,5%)	13 (76,5%)	0
Summe	63	114	3

Abb 8

Kern-Barr-Körperchen Relation

	kleines	gleiches	Größeres Barr	Keine Aussage
In Diamant-fuchsin stark verkleinerte Zellkerne (Summe = 23)	7 (30%)	12 (52%)	2 (9%)	2 (9%)

Abb 9

Kleiner Kern,kleines Barr-Körperchen?

2.2.5 Einschnürung und Zweiteilung des Barr-Körperchens nach der Umfärbung

Eine Zweiteilung des Barr-Körperchens nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin konnte in 12% der 180 untersuchten Zellkerne beobachtet werden (KLINGER 1957 b).Ebenso oft (12%) wurde in dieser Färbung eine Einschnürung des Barr-Körperchens gefunden (in Abb 2 rechte Aufnahme ist z.B. eine herzförmige Einschnürung zu sehen!).Zwei Barr-Körperchen konnten eindeutig in 4 Zellkernen (2,2%) gesehen werden.Bei 6 Zellen war nicht eindeutig zu entscheiden,ob es sich um zwei getrennte Barr-Körperchen,ein zweigeteiltes oder ein anderes,ähnlich fluoreszierendes Chromatinbröckchen an der Zellkernmembran handelte.Das entspricht einem Prozentsatz von 3,3%. Eventuell mögliche Fluoreszenzen eines Y-Chromosoms oder andere autosomale Fluoreszenzen wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt,da von phänotypisch normalen weiblichen Personen ausgegangen wurde.

3 Diskussion

3.1 Material und Methode

3.1.1 Haarentnahme

Die Haarentnahme wurde an 16 phänotypisch normal erscheinenden Frauen im Alter zwischen 18 und 30 Jahren vorgenommen.Die Auswahl erfolgte zufällig.Die Gewinnung des Haarmaterials wurde im wesentlichen von anderen Autoren übernommen (SCHMID 1967 ; ENGEL et al. 1970 a und b ; KATZ und WRIGHT 1970 ; SCHWINGER et al. 1971).
Einzelne Haare werden mit der Pinzette ca. 1-2 cm über der Kopfhaut erfaßt und ruckartig aus der Kopfschwarte herausgezogen.Durch viele von uns durchgeführte Reihenuntersuchungen zur Darstellung des Y-Fluoreszenzkörperchens (SCHWINGER 1977) sowie des Sex-Chromatinkörperchens bei Sportlerinnen,hat sich die Scheitelregion zur Haarentnahme als sehr günstig erwiesen. In diesen Bereichen der Kopfhaut scheint das Unterhautgewebe meistens elastischer zu sein.Diese Elastizität verhindert offenbar ein vorzeitiges Abbrechen der Haare.Trotzdem kommt es oft vor,daß die Haare bei besonders dünnem oder sprödem Haar schon über der Kopfhaut abbrechen und dann keine Wurzel mitgezupft wird.In solchen Fällen empfiehlt es sich,Haare aus der lateralen Augenbrauengegend zu ziehen,da auch hier weiches Unterhautgewebe vorliegt.Die Bulbi aus dem Augenbrauenbereich erscheinen schon makroskopisch in der Regel kleiner als die Haarwurzeln der Kopfhaut ; es wird aber nach der entsprechenden Präparation fast immer ausreichendes und gut verwertbares Zellmaterial gefunden.
Mikroskopisch eignen sich zur weiteren vergleichenden Untersuchung am besten Zellen aus dem Bereich der äußeren Haarwurzelscheide oder auch aus der Haarzwiebel (Abb.10).Zellen aus dem Bereich der Haarrinde sind oft spindel- bis fadenförmig und zeigen nach unseren Erfahrungen selten gut auszuwertende Barr-Körperchen.Zusätzlich sind die Zellkerne aus der Haarrinde - besonders im Papillenbereich - meistens mit Pigmentkörnern

vollgepackt,sodaß eine genauere Beurteilung des Zellkerninneren unmöglich wird.

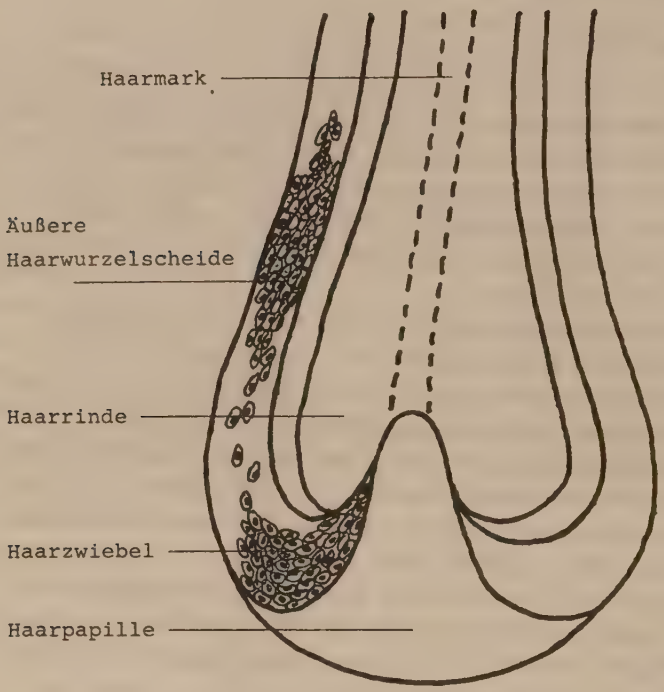

Abb. 10

Haarwurzel schematisch dargestellt

(Für die vergleichende Untersuchung eignen sich besonders Zellen aus dem Bereich der äußeren Haarwurzelscheide und der Haarzwiebel.Die Zellen dort sind vielfach kubisch bzw. polygonal und zeigen gut zu beurteilende Kerne.Zellen der Haarrinde sind oft spindelförmig oder aber durch Pigmentkörner überlagert)

3.1.2 Präparation

Bei der Aufbringung der Zellkerne auf den Objektträger sollte unbedingt darauf geachtet werden,daß man die Haare vorsichtig schräg auf das Glas aufsetzt und dann zügig in mehreren parallelen Bahnen über die Querseite des Objektträgers ausstreicht. Sonst kann es häufiger vorkommen,daß sich die Bulbi vom Haarschaft lösen und an einer Stelle auf dem Objektträger haften bleiben.Damit geht das Haar für die weiteren Untersuchungen verloren,weil die nun verklumpten Zellpakete sich weder photographisch gut darstellen lassen noch später ausgewertet werden können.Wenn der Haarbulbus durch häufiges Ausstreichen auf dem Objektträger zu sehr abgetrocknet ist,ohne daß Zellen am Glas haften geblieben sind,kann nochmals in Essigsäure nachfixiert werden.

Die von SCHMID 1967 und von FRANÇOIS et al. 1971 angegebenen Präparationen der Haarwurzelzellkerne haben sich nach unseren Erfahrungen als nicht vorteilhaft erwiesen,weil bei der mechanischen Zerkleinerung der Bulbi mit Hilfe einer Nadel,Zellen aus allen Schichten der Haarwurzel auf den Objektträger gelangen und wahllos verteilt werden.Dadurch erscheinen zu viele nicht verwertbare Zellkerne aus dem Bereich der Haarrinde in der Präparation (Siehe Abb 9).Zusätzlich kommt es zu einer übermäßigen mechanischen Beschädigung der Zellkerne.

Im Gegensatz dazu hat sich unsere Methode des Ausstreichens der Haarbulbi deshalb bewährt,weil der Abstand der Zellkerne meist so groß wird,daß beim Mikroskopieren (100-fache Vergrößerung) nicht zu viele Zellen im Blickfeld erscheinen.Sonst wird durch zuviel zerstörtes Cytoplasma sowie Verunreinigungen und Überstrahlung in der Fluoreszenzfärbung eine genauere Auswertung der Zellkerne erschwert.

Erwähnenswert ist weiter,daß bei der Prüfung,ob auch genügend Zellbahnen am Objektträger haften geblieben sind,immer das Mikroskop zur Hilfe genommen werden sollte.Fixiermittel und abgeschilfertes Cytoplasma hinterlassen auf dem Objektträger makroskopisch "schlierige" Bahnen,die bei mikroskopischer Betrachtung dann oft keine Zellkerne enthalten.

3.1.3 Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid

Die Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid bzw. Quinacrine Mustard bereitet im allgemeinen keine Probleme.Sie geht auf STRUGGER (1940) und SCHIFFER (1961) zurück,wurde weiterentwickelt und angewandt durch VOSA (1970),CASPERSSON et al.(1970 b und c) und MAJEWSKI et al. (1971). ZECH konnte im Jahr 1969 an Pflanzen- und Tierzellen zeigen,daß der lange Arm des Y-Chromosoms nach Färbung mit Quinacrine Mustard (QM),einem Fluoreszenzfarbstoff,stark aufleuchtete. Eine Fluoreszenz in der Interphase des Zellzyklus des Y-Chromosoms konnten CASPERSSON et al. (1970 a und b) ,PEARSON (1970) , PEARSON et al. (1970 und 1971) beim Mann nachweisen.Zunächst wurde aber noch angenommen,daß eine Geschlechtsbestimmung mit der QM-Färbung nur für XY-Träger möglich sei.
GREENSHER et al. (1971) und auch MUKHERJEE et al. (1972) konnten aber auch das Barr-Körperchen mit QM in Zellen aus der Amnionflüssigkeit und in Fibroblastenkulturen verschiedener menschlicher Gewebe zur Darstellung bringen.Eine Unterscheidung der beiden Fluoreszenzen in der Interphase (Y-Fluoreszenzkörperchen und Barr-Körperchen) bereitet heute keine Schwierigkeit.Bei der Identifikation des Y-Fluoreszenzkörperchens können sich jedoch öfter Probleme ergeben,da in den Interphasen häufig auch autosomale Fluoreszenzen zu sehen sind,die ein Y-body vortäuschen können (CASPERSSON et al. 1970 d).In der QM- oder auch der Quinacrine-Dihydrochloridfärbung (CASPERSSON et al. 1968) zeigt das Barr-Körperchen einmal eine größere Ausdehnung ,andererseits aber nicht die intensive Leuchtkraft des Y-Fluoreszenzkörperchens (ZECH 1969). Außerdem zeichnet sich das Barr-Körperchen oft durch eine ovale oder viereckige Form aus (MUKHERJEE 1972).Das Y-body hingegen stellt sich in der Interphase lediglich als kleiner intensiv fluoreszierender Punkt dar.Dem Geübten bereitet die Unterscheidung beider Fluoreszenzen keinerlei Schwierigkeit.

Offenbleiben muß zur Zeit eine befriedigende Antwort auf die Frage,wie der Einbau des Fluoreszenzfarbstoffen und anderer Chromosomenfarbstoffe in das DNS-Molekül erfolgt (COMINGS 1972). Möglichkeiten für den An- oder Einbau des Farbstoffs an die heterochromatischen Abschnitte der Chromosomen werden von CASPERSSON et al. (1968,1969,1970 a-c) diskutiert.Es gilt als sicher,daß sich die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Quinacrine Mustard und Quinacrine-Dihydrochlorid - obwohl unterschiedlich in ihrem chemischen Aufbau - an gleicher Stelle in das DNS-Molekül einfügen.
Wir führten die Färbung der Haarwurzelzellkerne in der von PEARSON (1970) , PEARSON et al. (1970) und CASPERSSON et al. (1970 a und b) beschriebenen Weise durch.
Es muß darauf geachtet werden,daß keine überalterten oder verunreinigten Färbelösungen zur Anwendung kommen.Außerdem sollen die Färbezeiten genau eingehalten werden,da bei einer Über- oder aber auch Unterfärbung keine exakte Beurteilung der Feinstruktur des Zellkerns möglich ist.Dabei soll hier festgehalten werden,daß bei unseren Untersuchungen Unterschiede in der Farbintensität bei den einzelnen Probandinnen festzustellen waren,auch wenn die von den Autoren angegebenen Färbezeiten genau eingehalten wurden.

3.1.4 Umfärbung

Die Entfärbung der Präparate sowie die erneute Einfärbung mit Diamantfuchsin erwies sich als problemlos.Eine Möglichkeit der Umfärbung wurde schon von GREENSHER et al. (1971) angegeben. Er verwendete für die Umfärbung nicht Diamantfuchsin,sondern Karbolfuchsin.Eine identische Lage des Barr-Körperchens im Zellkern wird nach der Umfärbung beschrieben.Auf eventuell vorhandene Größen- oder Strukturunterschiede des Barr-Körperchens wird vom Untersucher nicht zusätzlich eingegangen.
Weitere Arbeiten zum Fragenkomplex der Umfärbung gleicher Zellkerne und möglicher Abweichungen,was die Frequenz des Barr-Körperchens anbelangt,waren die von MILES (1961), de MARS (1962),

SCHWARZACHER (1963) und MUKHERJEE et al. (1972).Sie untersuchten zunächst Zellkerne in vivo unter dem Phasenkontrastmikroskop und schlossen eine Feulgen- beziehungsweise Thioninfärbung an. Nach der Einfärbung erschien das identische Sex-Chromatinkörperchen dichter und schärfer begrenzt.Allerdings ist bei der In-vivo-Betrachtung das Barr-Körperchen um 30% weniger zu erkennen als nach der Einfärbung.In den gefärbten Präparaten stellt sich das Barr-Körperchen in 10% der untersuchten Zellkerne nicht dar, das heißt,nach den Untersuchungen dieser Autoren waren die Zellen zu 90% Sex-Chromatinpositiv.

3.1.5 Photographie

Zur Technik des Photographierens der Interphasezellkerne sollen noch einige Bemerkungen gemacht werden.Die Übersichtsaufnahmen mit der Polaroidkamera sind nicht unbedingt erforderlich,erleichtern dem Ungeübten das Wiederauffinden der Zellkerne;denn anhand der Polaroidaufnahmen ist es schon bei mittlerer mikroskopischer Vergrößerung und ungefährer Noniuseinstellung möglich den entsprechenden Zellbezirk in einer Zellbahn wiederaufzufinden,in dem sich der gesuchte umgefärbte Zellkern befindet.Außerdem kann der näher zu untersuchende Zellkern auf der Polaroidübersichtsaufnahme markiert werden.So wird mit Sicherheit nach der Umfärbung die entsprechende Zelle schnell wiedergefunden.

Bei exakter Noniuseinstellung und genauer schriftlicher Beschreibung von Zellkernform sowie der Lage des Barr-Körperchens im Kern,kann gegebenenfalls nach längerer Übung aus Zeitersparnis auf die Übersichtsaufnahmen mit der Polaroidkamera verzichtet werden.
Problematisch war mitunter die Frage,ob nach Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid eine gut verwertbare Aufnahme (100-fache Vergrößerung ; Objekte in Phosphatpuffer eingedeckt) eines Zellkerns entstanden war.Durch die hohe Wärmeerzeugung der Mikroskoplampe kann es zu einer vorzeitigen Verdunstung oder auch zum Abfließen des Phosphatpuffers zwischen Objektträger und Deckglas kommen.Dadurch wird die Ebene der maximalen Schärfe im Mikroskop verschoben.Der Zellkern stellt sich nur unscharf oder über-

haupt nicht mehr dar.Deshalb empfiehlt es sich nach Belichtung des Films noch einmal nachzuprüfen,ob auch ausreichend Pufferlösung zwischen den Gläsern vorhanden ist.Im Zweifelsfall muß das Präparat erneut mit Phosphatpuffer eingedeckt und abphotographiert werden.

Diese Schwierigkeiten ergaben sich nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin nicht,da die Präparate in Eukitt eingedeckt und damit konserviert waren.Bei der Einbettung ist lediglich darauf zu achten,daß blasenfreies Eukitt auf den Objektträger aufgebracht wurde.Blasen entstehen häufig dadurch,daß das Eukitt vor der Verwendung nochmal umgerührt wird.Außerdem sollten pro Präparat nur ein bis zwei Tropfen Eukitt verwendet werden,damit der Abstand zwischen Objektträger und Deckglas möglichst klein gehalten wird.Sonst kann durch die unterschiedlichen Brechungsindexe der Medien (Phosphatpuffer und Eukitt) eine Größenänderung der zu photographierenden Objekte entstehen.Schließlich sollten die Objektträger nach der Einbettung in Eukitt ungefähr 24 Stunden horizontal gelagert werden,damit das Medium gleichmäßig verteilt und gut eingetrocknet ist.Sonst ist es möglich, daß beim Verschieben der Präparate unter dem Mikroskop,eine mechanische Beschädigung der Zellkerne resultiert und somit eine weitere Beurteilung erschwert oder sogar unmöglich wird (Siehe Abb 1 Fall 13).

Das Abphotographieren der mit Diamantfuchsin gefärbten identischen Zellkerne muß unter entsprechender Abblendung der Lichtquelle sowie der Wahl bestimmter Filter erst ausprobiert werden und kann von Fall zu Fall variieren.Die Herstellung der Zellkernbilder nach der Umfärbung ist problemlos und beliebig oft reproduzierbar.

3.2 Auswertung und Ergebnisse

3.2.1 Subjektivität der Beurteilung

Die Auswertung der in beiden Färbungen abphotographierten Zellkerne erfolgte in mehreren Untersuchungsgängen.Die Subjektivität der Beurteilung spiegelt sich an den Parametern der Messung und der Fehlerbreite der optischen Betrachtung durch den Untersucher wider.Auf diese Bemessungsgrundlagen soll kurz eingegangen werden :
Die Zellkerngröße wurde nach ihrem größten Durchmesser (d) mit einem Zentimetermaß ausgemessen (Abb 4).Daraufhin wurden die Parameter für große (größer 12 cm),mittlere (9-12 cm) und kleine (kleiner 9 cm) Zellkerne festgelegt.Diese Einteilung erfolgte willkürlich (Abb 4 und Abb 5).Die Ausmessung der Zellkerne wurde nach der Umrißskizze (Abb 4) durchgeführt.Geringe Fehler können bei der Festlegung des größten Durchmessers (d) entstanden sein, da ein großer oder kleiner Durchmesser nicht zwingend den Schluß darüber zuläßt,ob ein "räumliches Gebilde" auch groß oder klein sein muß.Immerhin wurde versucht,bei der nur möglichen zweidimensionalen Betrachtung der Zellkerne,nur ovale oder runde Kerne für die Untersuchung auszuwählen,um die Fehlergröße bei der Messung des größten Durchmessers hinreichend klein zu halten.
Nach dieser Festsetzung der Größen ergab sich,daß über 70% der Zellkerne in der Kategorie "mittelgroß" einzuordnen waren,also die eindeutige Mehrheit aller 180 photographierten Zellen.

Häufiger waren exakte Umrißskizzen der Zellkerne nach Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid schwierig,da eine genaue Abgrenzung der Peripherie des Kernes nicht möglich war.Diese Ungenauigkeit in der Bewertung resultierte auch aus der nach starker Vergrößerung der Filmnegative sich ergebenden Unschärfe bei der Projektion auf das Papier.
Um die Fehlerbreite hier möglichst klein zu halten,wurden im Zweifelsfall zunächst die Negative der mit Diamantfuchsin gefärbten Zellkerne auf das Papier projiziert,da in dieser Färbung die Umrisse meistens schärfer waren.Bei der Bewertung wurden dann diese Zellkerne immer als in beiden Färbungen "gleichgroß" angesehen.

Auch die Beurteilung der Barr-Körperchen - was ihre flächenmäßige Ausdehnung anbelangt - unterlag,ähnlich wie die Kerngröße, einer subjektiven Beurteilung.Die Größenunterschiede wurden anhand der Übereinanderprojektion der Barr-Körperchen in beiden Färbungen ermittelt,das heißt,optisch relativiert.Der Umriß des Barr-Körperchens war in der Quinacrine-Dihydrochloridfärbung deshalb öfter nur ungenau skizzierbar,da die Fluoreszenz vom Zentrum zur Peripherie hin abnimmt und somit die exakte Festlegung der Hell-Dunkelgrenze erschwert wurde.Um in solchen Fällen die Fehlerbreite gering zu halten,wurde subjektiv ein Mittelwert der äußeren Begrenzung des Barr-Körperchens auf das Papier gezeichnet.In der Diamantfuchsinfärbung waren sowohl Zellkern- wie auch Barr-Körperchenumrisse durch den ausgeprägteren Hell-Dunkelkontrast fast immer einfach nachzuzeichnen.
Es wurde ferner versucht,das Barr-Körperchen in seinem größten Längsdurchmesser zu ermitteln.Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Millimetermaßes.Danach besaßen große Barr-Körperchen nach Projektion auf das Papier einen Durchmesser von über 20 mm , mittlere einen von 15-20 mm und kleine einen solchen von unter 15 mm .Auch hier erfolgte die Festlegung willkürlich.Die Beurteilung der Barr-Körperchengröße unterlag der gleichen Subjektivität wie die Ausmessung der Zellkerndurchmesser (d).

3.2.2 Frequenz des Barr-Körperchens

Die von uns ermittelte Frequenz des Barr-Körperchens in der Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid betrug 36% mit Schwankungen zwischen 27% und 45% .Damit lag die Häufigkeit der in den Zellkernen gefundenen Barr-Körperchen auch in dem Bereich der von anderen Autoren in unterschiedlichen Färbungen angegebenen Prozentzahlen (KLINGER 1957 b ; KLINGER und SCHWARZACHER 1960 ; KLINGER et al. 1967 ; CURTIS 1970 ; HEIL 197o ; FRANÇOIS et al. 1971 ; GREENSHER et al. 1971 ; KAILIN und PLATT 1971).
Bis heute ist nicht bekannt,warum das Barr-Körperchen immer nur zu einem bestimmten Prozentsatz in den Zellkernen gesehen werden kann.

Fest steht sicherlich,daß das Barr-Körperchen in den verschiedenen Geweben eines Individuums in unterschiedlicher Frequenz sichtbar ist.KLINGER et al. (1968) stellten einen höheren Prozentsatz an Barr-Körperchen fest,wenn die Zelldichte in Gewebekulturen zunimmt.MITTWOCH(1967) und ISSA et al.(1969) sowie SCHNEDL (1969) vermuteten einen Zusammenhang zwischen Zellgröße und Häufigkeit des Barr-Körperchens.Bei jungen Embryos (PARK 1957),deren Zellteilungsrate sehr hoch ist,wird kein Barr-Körperchen gebildet (ISSA et al. 1969).HAGY und BRODRICK (1972) beobachteten eine Beziehung zwischen Sex-Chromatinhäufigkeit und Menstruationszyklus der Frau.THERKELSEN und LAMM (1966) haben höhere Frequenzen des Barr-Körperchens in DNS-produzierenden Zellen beobachtet,als in Zellkernen,die keine DNS synthetisieren.

Die Tatsache,daß das Barr-Körperchen in vivo unter dem Phasenkontrastmikroskop zu einem weitaus geringeren Prozentsatz sichtbar ist (JAMES 1960 ; SCHWARZACHER 1963),als nach Einfärbung mit unterschiedlichen DNS-spezifischen Farbstoffen zeigt,daß möglicherweise die chemische Beschaffenheit eines Farbstoffs auch einen Einfluß auf die Frequenz des Barr-Körperchens haben könnte.Auch bei Umfärbungen von Fluoreszenzfarbstoffen in klassische Färbungen werden unterschiedliche Frequenzen des Barr-Körperchens gefunden (MUKHERJEE 1972).Ob eine unterschiedliche Affinität der einzelnen Farbstoffe zur DNS der Chromosomen besteht,ist nicht sicher bekannt.

Außer den eben angeführten Vermutungen,die eine unterschiedliche Häufigkeit des Barr-Körperchens in bestimmten Geweben zu erklären versuchen,muß noch kurz auf das besondere Verhalten der X-Chromosomen hingewiesen werden:

Durch Untersuchungen an lebenden Zellkulturen konnte gezeigt werden,daß die Frequenz des Barr-Körperchens während der logarithmischen Phase des Zellwachstums abnimmt (MILES 1961 ; SCHNEDL 1964 ; THERKELSEN und LAMM 1966).Dieses Phänomen wurde dadurch zu erklären versucht,daß die Heteropyknose des einen X-Chromosoms (das X-Chromosom,welches das Barr-Körperchen bildet) verschwindet.Dieses Unsichtbarwerden beruht auf der Entspiralisierung des Chromosoms während der DNS-Synthese (KLINGER et al. 1967).

In diesem Zeitraum repliziert das das Barr-Körperchen bildende X-Chromosom. KLINGER (1967) fand aber heraus,daß die Häufigkeit des Barr-Körperchens beim Menschen in allen Phasen des Zellzyklus gleich ist.Daraus schloß KLINGER,daß die Replikation der DNS entweder ohne Dekondensation des X-Chromosoms vonstatten gehen könne oder aber die Dauer der Entspiralisierung sehr kurz sein müsse.Daraus kann sich die Konsequenz ergeben,daß die Sex-Chromatin-negativen Zellen nicht die Phase des Zellzyklus darstellen, in der die DNS sich verdoppelt (SCHWARZACHER und PERA 1970).

Eine befriedigende Antwort auf die Frage nach der unterschiedlichen Frequenz des Barr-Körperchens kann bis heute nicht gegeben werden.Ähnlich können nur Vermutungen darüber angestellt werden, weshalb das Barr-Körperchen nicht in all den Zellkernen zu sehen ist,in denen es vermutet werden müßte.
An dieser Stelle soll noch kurz auf das unterschiedliche Verhalten der beiden X-Chromosomen eingegangen werden.Ursprünglich wurde angenommen,daß beide X-Chromosomen das Barr-Körperchen bilden (KLINGER et al. 1968 ; OHNO et al. 1959 ; JAMES 1960 ; MILES 1961). Untersuchungen von OHNO et al. (1959) und OHNO und MAKINO (1961) haben gezeigt,daß nur eines der beiden X-Chromosomen das Barr-Körperchen bildet und zwar durch positive Heteropyknose,d.h., Kondensation eines X-Chromosoms oder zumindest von Teilen desselben (OHNO et al. 1959 ; OHNO und MAKINO 1961 ; RUSSELL 1963 ; KLINGER et al. 1968). CASPERSSON et al. (1968) vermuteten,daß das X-Chromosom,welches das Barr-Körperchen bildet,eine andere chemische Struktur besitze als das euchromatische X-Chromosom.Untersuchungen an Frauen mit drei und mehr X-Chromosomen (CARR et al. 1961 ; GRUMBACH und MORISHIMA 1962 ; GRUMBACH et al. 1963 ; BARR et al. 1969) ergaben,daß die Anzahl der im Zellkern sichtbaren Barr-Körperchen immer um eines weniger ist,als die Zahl der vorhandenen X-Chromosomen.Das heißt praktisch,daß bei Individuen mit drei X-Chromosomen zwei Barr-Körperchen im Interphasezellkern erscheinen (GRUMBACH et al. 1963), bei solchen mit vier X drei Barr-Körperchen u.s.w. Hierfür stellte HARNDEN (1961) folgende Formel auf : $B = X - P/2$,wobei B die maximale Anzahl der Barr-Körperchen, X die Anzahl der X-Chromosomen und P den doppelten Satz an Autusomen verkörpert.

Heute gilt als gesichert,daß sich die beiden X-Chromosomen normaler Frauen während des Zellzyklus unterschiedlich verhalten (MORISHIMA et al. 1962).Schon früh in der embryonalen Entwicklung bleibt das eine der beiden X-Chromosomen euchromatisch (geringe Anfärbbarkeit).Dieses ist genetisch aktiv (Lokalisation vieler Gene) und in der Interphase nicht sichtbar aufgrund eines geringen Kondensationsgrades.Das andere X-Chromosom repliziert spät (CHERNICK 1968; CITOLER und GROPP 1969; ISSA et al. 1969),liegt mehr oder weniger kondensiert vor (positiv heteropyknotisch) (LEE und YUNIS 1971),ist genetisch inaktiv (GRUMBACH et al. 1963) und stellt sich mit DNS-Farbstoffen spezifisch als Barr-Körperchen im Interphasezellkern dar.Beim Mann scheint das X-Chromosom genetisch aktiv zu sein (isopyknotisch,spezifisch nicht anfärbbar,nicht kondensiert).Bei Menschen mit mehr als einem X-Chromosom ist stets nur ein X aktiv,das heißt,in der Interphase nicht anfärbbar und damit nicht sichtbar (LYON 1961, 1968, 1970).Alle zusätzlich in einem Zellkern befindlichen X-Chromosomen stellen sich als Barr-Körperchen dar (GRUMBACH et al. 1963; LYON 1971,1972).
Für das Heterochromatin charakteristisch ist die gegenüber dem Euchromatin verspätete DNS-Synthese (COMINGS 1969).Sie wurde durch autoradiographische Messungen an Geschlechtschromosomen von Säugetieren (LIMA de FARIA et al. 1965) und beim Menschen (TAYLOR 1960; GERMAN 1962 a,b ; GILBERT et al. 1962 ; MORISHIMA et al. 1962 ; GRUMBACH und MORISHIMA 1962 ; SCHMID 1963 ; KLINGER et al. 1967 ; HEIL 1970) nachgewiesen.
Eine weitere Besonderheit des Heterochromatins besteht darin, daß während der Interphase keine Messenger-RNS synthetisiert wird (MONESI 1969).Das ließ sich durch nur geringe beziehungsweise überhaupt keine Aufnahme von ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Cytidin bei der RNS-Synthese nachweisen (CLEVER 1968 ; MONESI 1969).Daraus könnte sich die Konsequenz ergeben,daß durch die geblockte RNS-Synthese eine Unterdrückung der genetischen Information in einem heterochromatischen Chromosomenabschnitt erfolgt.
Andererseits haben SCHWARZACHER und PERA (1970) nachweisen können, daß das kondensierte X-Chromosom weiblicher Säugetiere DNS zu synthetisieren vermag.Diese Feststellung könnte das Gegenteil

beweisen,nämlich,daß auch das Heterochromatin nicht unbedingt inaktiv zu sein braucht.
Der Grund,warum das Heterochromatin später repliziert als das Euchromatin,ist unbekannt (COMINGS 1972).Es bedarf weiterer Forschungen,um dieses Phänomen zu klären.

3.2.3 Zellkerngröße

Die Zellkerngröße differierte nach den beiden Färbungen und zwar nicht stets im Sinne einer Verkleinerung (Insgesamt 77%),sondern auch einer Vergrößerung nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin (4%).
Manchmal konnte bei zufällig mitphotographierten Zellkernen auf einer Aufnahme unterschiedliche Abstände von Zelle zu Zelle beobachtet werden.Der Zellkernabstand erschien dann immer in der Diamantfuchsinfärbung größer.Da es sich aber hier sicherlich um die mechanische Behandlung der Präparate (Eindeckung) sowie um chemische Einflüsse unterschiedlicher Art auf die Präparate (Hydrolyse,Alkoholbad,Säureversetzung) handeln dürfte,wurde auf diese zufällige Beobachtung nicht näher eingegangen.
Die unterschiedlichen Zellkerngrößen in beiden Vergleichsfärbungen wurden anhand der Übereinanderprojektion der Negativbilder durch den Vergrößerungsapparat ermittelt.Diese Projektion hatte den Vorteil,daß die Vergrößerungsmaßstäbe in jedem Fall eingehalten werden konnten.Dieses Kriterium wurde bei der vergleichenden Betrachtung der Positivabzüge in beiden Färbungen nicht notwendigerweise mitberücksichtigt.
Selbst unter der Annahme einer doch relativ hohen Fehlerbreite (Siehe 3.2.1) zeigten sich nach beiden Färbungen sichtbare und somit meßbare Unterschiede in den Kerngrößen.Es muß vermutet werden,daß diese Unterschiede als ein Produkt der mannigfachen mechanischen und chemischen Behandlung anzusehen sind.Warum immerhin 4% der Zellkerne nach der Umfärbung nicht verkleinert,sondern vergrößert erschienen,kann nicht beantwortet werden.

3.2.4 Lage und Größe des Barr-Körperchens

Die vergleichende Betrachtung der Positivabzüge (Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid) und den mit Diamantfuchsin gefärbten Präparaten unter dem Lichtmikroskop (100-fache Vergrößerung) ließ eine Aussage darüber zu,ob
a) ein eindeutig identifizierbares Barr-Körperchen nach dem Umfärbeprozeß vorhanden war und
b) die Lage und Struktur nach beiden Färbungen übereinstimmte.
Anhand der Positivabzüge aus beiden Färbungen (Siehe Abb 2) konnte - gleiche Vergrößerung vorausgesetzt - eine Größen- sowie Strukturveränderung des Barr-Körperchens ermittelt werden.

Genauere Aussagen hinsichtlich einer unterschiedlichen Lage des Barr-Körperchens im Zellkern sowie seiner verschiedenen Struktur (Äußere Begrenzung) konnten allerdings nur anhand der Übereinanderprojektion der Filmnegative aus beiden Färbungen und der sich daran anschließenden Anfertigung von Umrißskizzen gemacht werden. Der Vergrößerungsapparat sicherte auch bei diesem Untersuchungsgang für beide Färbungen gleiche Vergrößerungsmaßstäbe.

Die Lage des Barr-Körperchens im Zellkern stimmte zu 90% nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin überein.Diese Prozentzahlen wurden auch von anderen Untersuchern beschrieben (SCHWARZACHER 1963 ; HEIL 1970 ; CURTIS 1970).Eine leichte Lageabweichung nach der Umfärbung kann im Zusammenhang mit einer geringgradigen Kernveränderung (Vergrößerung oder Verkleinerung) gesehen werden.Addiert man die Anzahl der Zellkerne mit nur geringer Verkleinerung (64%) und gleichgroße Zellkerne (23%) nach der Umfärbung,ergibt das fast 90% (genau 87%),also den Prozentsatz,bei dem keine Lageabweichung des Barr-Körperchens zu ermitteln war.

3.2.5 Struktur des Barr-Körperchens

Es ließ sich weiterhin feststellen,daß eine Umrißskizze des Barr-Körperchens nach der Diamantfuchsinfärbung oft genauer möglich war,als nach Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid.Nach der Umfärbung sieht das Barr-Körperchen häufig schärfer begrenzt in seinem Umriß aus (43%).

Nach der Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid hingegen konnte eine scharfe äußere Begrenzung des Barr-Körperchens nur in 2% gesehen werden,da die Leuchtintensität des Farbstoffs zur Peripherie des Sex-Chromatins hin abnimmt.Dieses Phänomen erschwerte die Aussage über eine Vergrößerung oder Verkleinerung des Barr-Körperchens nach der Umfärbung (24%).Die Antwort nach der Frage, ob eine Vergrößerung (4%) oder Verkleinerung (24%) ähnlich zu deuten ist wie die Kerngrößenunterschiede nach beiden Färbungen, muß offen bleiben.

Eine mögliche Erklärung für die von uns häufiger beobachtete grössere flächenmäßige Ausdehnung des Barr-Körperchens in der Quinacrine-Dihydrochloridfärbung kann sicherlich die Feststellung sein, daß die feinen,zum Teil füßchenartigen Ausläufer des Barr-Körperchens in den klassischen DNS-Färbungen besser gesehen werden können.Durch die Färbung mit Atebrinfarbstoffen hingegen werden die Räume zwischen den kleinen Ausläufern überstrahlt und können so eine größere Flächenausdehnung vortäuschen.

Wir haben auch häufiger eine V-Form oder auch herzförmige Einschnürungen (12%) am Barr-Körperchen beobachtet (Siehe Abb 2).Ebenso oft wurde von uns die schon von KLINGER (1957b)beschriebene Zweiteilung des Barr-Körperchens gesehen (12%).Diese auch als "bipartite form" bezeichnete Besonderheit konnte in der Fluoreszenzfärbung - offensichtlich durch den Überstrahlungseffekt bedingt - weniger deutlich oder überhaupt nicht gesehen werden (Abb 2) und (Abb 3).

Die Auswertung der Untersuchung,ob in großen Zellkernen auch mehr große Barr-Körperchen gesehen werden als in mittleren oder kleinen,ließ erkennen,daß in 44% der Fälle in großen Kernen auch große Barr-Körperchen zu beobachten waren.Nur ungefähr die Hälfte (23%) an großen Barr-Körperchen fanden wir auch in den von uns als "klein" bezeichneten Zellkernen.Der weitaus überwiegende Teil an mittelgroßen Barr-Körperchen wurde auch in den von uns wilkürlich festgelegten "mittelgroßen" Zellkernen beobachtet (63%). Das bedeutet,daß es keine Beziehung zwischen Zellkern- und Barr-Körperchengröße zu geben scheint.

4 Resumé

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen haben gezeigt, daß die Anfärbung von Epithelzellkernen - in diesem Falle Haarwurzelzellkerne - mit Quinacrine-Dihydrochlorid eine geeignete Methode zur Bestimmung des Barr-Körperchens darstellt.Die von uns häufiger beobachtete unschärfere äußere Begrenzung des Barr-Körperchens in dieser Färbung hat für den routinemäßigen Einsatz bei Screening-Untersuchungen oder für die klinische Geschlechtschromatindiagnostik keine Bedeutung. Gegenüber den klassischen Barr-Körperchenfärbungen - wie auch Diamantfuchsin - hat die Quinacrine-Dihydrochloridfärbung den Vorteil,daß sowohl das Barr-Körperchen als auch das Y-Chromatin in nur einer Färbung dargestellt werden.Somit können die im Interphasezellkern kondensiert vorliegenden Geschlechtschromosomen in einem Untersuchungsgang erfaßt werden.Nicht zu übersehende Nachteile sind der zu diesen Untersuchungen erforderliche enorme Zeitaufwand und die recht teure mikroskopische Ausrüstung.

5 Zusammenfassung

Locker strukturierte Zellkerne der äußeren Haarwurzelscheide eignen sich zur Darstellung des Barr-Körperchens mit dem Fluoreszenzfarbstoff Quinacrine-Dihydrochlorid.
Bei 16 phänotypisch normal erscheinenden Frauen wurde das Barr-Körperchen nach Quinacrine-Dihydrochloridfärbung in durchschnittlich 36% der Haarwurzelzellkerne gesehen.
Nach Entfärbung und Wiedereinfärbung identischer Zellkerne wurden vergleichende Schätzungen hinsichtlich der Zellkerngröße,der Größe und besonderen Form des Barr-Körperchens für beide Färbungen durchgeführt.
Insgesamt wurden 180 Zellkerne in jeder Färbung für die vergleichende Untersuchung ausgewertet.Eine geringe Größenabnahme der Zellkerne zeigte sich zu 64% nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin.Eine stärkere Verkleinerung konnte in 13% beobachtet werden.In 23% waren die Zellkerne nach beiden Färbungen gleichgroß.
Die Lage des Barr-Körperchens im Zellkern war nach beiden Färbungen zu 89% identisch,in 9% geringgradig verändert;in 2% der untersuchten Zellkerne stimmte die Lage nicht überein.

Die Schätzung der flächenmäßigen Ausdehnung des Barr-Körperchens ergab zu 67% gleiche Größe,in 24% erschien es in der Fluoreszenzfärbung größer,in 4% kleiner als nach der Diamantfuchsinfärbung.In 5% der Fälle war ein Größenvergleich der Barr-Körperchen in beiden Färbungen nicht möglich.Es muß vermutet werden, daß diese Größendifferenzen Folge des Umfärbeprozesses sind.

Eine Korrelation zwischen Zellkern- und Barr-Körperchengröße konnte von uns nicht beobachtet werden.
Nach Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid war das Barr-Körperchen häufiger rund geformt (19%) als nach Diamantfuchsinfärbung (8%).Oval bis viereckig war es in der Fluoreszenzfärbung in 81%, nach Diamantfuchsin in 92% der untersuchten Zellkerne.
Das Barr-Körperchen erschien nach der Umfärbung mit Diamantfuchsin häufig in seinen Umrissen unregelmäßiger begrenzt.Vermutlich durch den Überstrahlungseffekt des Fluoreszenzfarbstoffes bedingt,

konnten die feinen Randstrukturen und die oft füßchenartigen Ausläufer des Barr-Körperchens in der Färbung mit Quinacrine-Dihydrochlorid nicht gesehen werden.
Ausgeprägte Einschnürungen sowie die häufiger auch beobachtete Zweiteilung des Barr-Körperchens wurden in der Diamantfuchsinfärbung in je 12% der untersuchten Zellkerne beobachtet.Diese Strukturbesonderheit des Barr-Körperchens war in der Fluoreszenzfärbung - offenbar durch einen Überstrahlungseffekt des Farbstoffes - nicht zu sehen.

6 Literaturverzeichnis

BARLOW, P., VOSA, C.G.: The Y - chromosome in human spermatozoa
Nature (Lond.) 226,961-962 (1970)

BARR, M.L., BERTRAM, E.G.: A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis
Nature (Lond.) 163,676-677 (1949)

BARR, M.L., Bertram, L.F., Lindsay, H.A.: The morphology of the nerve cell nucleus, according to sex
Anat. Rec. 197, 283-292 (1950)

BARR, M.L.,Sergovich, F.R., Carr, D.H., Shaver, E.L.: The triplo - X female
Canad. Med. Assoz. J. 101, 247-258 (1969)

CARPENTIER, P.I.: Sex chromatin in smears from reproductive and urinary tracts. In: MOORE, K.L. (ed.) The sex chromatin
Philadelphia and London: W.B. SAUNDERS Co (1966)

CARR, D.H., Barr, M.L., Plunkett, E.R.: An XXXX sex chromosome complex in two mentally defective females
Canad. Med.Assoz. J. 84,131 (1961)

CASPERSSON, T., Faber, S., Foley, G.E., Kudynowski, J., Modest, E.J., Simonsson, E., Wagh, U., Zech, L.: Chemical differentiation along metaphase chromosomes Exp. Cell Res. 49, 219-222 (1968)

CASPERSSON, T., Zech, L., Modest, E.J., Foley, G.E., Wagh, U., Simonsson, E.: DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus Exp. Cell Res. 58, 141-152 (1969)

CASPERSSON, T., Zech, L., Johansson, C.: Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes Exp. Cell Res. 60, 315-319 (1970 a)

CASPERSSON, T., Zech, L., Johansson, C., Modest, E.J.: Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents Chromosoma (Berl.) 30,215-227 (1970 b)

CASPERSSON, T., Zech, L., Johansson, C.: Quinacrine mustard - fluorescence of human chromosomes 4, 5 and X Exp. Cell Res. 61, 474-475 (1970 c)

CASPERSSON, T., Zech, L., Johansson, C., Lindsten, J., Hultén, M.: Fluorescent staining of heteropycnotic chromosome regions in human interphase nuclei Exp. Cell Res. 61, 472-474 (1970 d)

CASPERSSON, T., de la Chapelle, A., Lindaten, J., Schröder, J., Zech, L.: Absence of brightly fluorescent Y material in XX men
Ann. Génét. 14, 3, 173-176 (1971)

CHERNIK, B.: Late synthesis of protein on the presumptive X-chromosome of the human female lymphocyte
Nature (Lond.) 220, 195-196 (1968)

CITOLER, P., GROPP, A.: DNS-Replikation von autosomalen Heterochromatin
Exp. Cell Res. 54, 337-346 (1969)

CLEVER, U.: Regulation of chromosome function
Ann. Rev. Genet. 2, 11-3o (1968)

COMINGS, D.E.: Incorporation of tritium of ^{3}H - Arginine into DNA as the explanation of "late synthesis of protein" on the human X-chromosome
Nature (Lond.) 221, 570 (1969)

COMINGS, D.E.: The structure and function of chromatin. In: Advances in human genetics by H.Harris and Kurt Hirschhorn
Plenum Press New York-London 237-431 (1972)

CURTIS, D.J.: Sex chromatin fequency in buccal mucosa tissue: The distribution of single,double and triple sex chromatin bodies
Hum. Gen. 11, 22-28 (1970)

DAVIDSON, R.G., SMITH,D.R.: A morphological sex difference in the polymorphonuclear neutrophil leucocytes
Brit. Med. J. 2, 6 (1954)

DEGE,U.: Darstellung des Sex-Chromatins in Haarwurzelscheiden
Z. Rechtsmedizin 71, 37-38 (1972)

DEGENHARDT, K.H.,GEISLER,M.: Kerngeschlechtsbestimmung an Haarwurzeln bei Sportlerinnen
Dtsch. Ärzteblatt 32, 2097-2099 (1972)

DE MARS, R.: Sex chromatin mass in living, cultivated human cells
Science 138, 980-981 (1962)

ENGEL, E., Moore, M.K., McGee, B.J.: Fluorescent male sex chromatin in hair root cells
Sth. med. J. (Bgham.Ala.) 64, 161-162 (1970 a)

ENGEL, E., Culbertson, J.C., Mahley, R.W., Fenichel, G.M.: Barr body studies from the hair
Lancet I, 789 (1970 b)

FRANÇOIS, J., Matton-van Leuven, M.Th., Acosta, J.: Male and female sex determination in hair roots
Clin. Genet. 2, 73-77 (1971)

GERMAN, J.L., III: Synthesis of desoxyribonucleic acid during interphase Lancet I, 744 (1962 a)

GERMAN, J.L., III : DNA synthesis in human chromosomes Trans. N.Y. Acad.Sci. 24, 395 (1962 b)

GILBERT, C.W., Muldal, S., Lajtha, L.G., Rowley, H.: Time-sequence of human chromosome duplication Nature (Lond.) 195, 869-873 (1962)

GODAY, C., Egozcueuy, J., Bafall, E.: Sex-chromatin fluorescence in hair-root cells Lancet 1971 I, 220

GRUMBACH, M.M., MORISHIMA, A.: Sex chromatin and the sex chromosomes on the origin of sex chromatin from a single X-chromosome Acta cytol. (Philad.) 6, 46 (1962)

GRUMBACH, M.M., Morishima,A., Taylor, J.H.: Human sex chromosome abnormalities in relation to DNA replication and heterochromatinization Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 49, 581-589 (1963)

GUTHERZ, S.: Zur Kenntnis der Heterochromosomen Arch. mikr. Anat. 69, 491-514 (1907)

HAGY, W.G., BRODRICK, M.M.: Variation of sex chromatin in human oral mucosa during the menstrual cycle
Acta Cytol. 16, 314-321 (1972)

HARNDEN, D.G.: Nuclear sex triploid XXY human cells
Lancet 1961 II, 488

HEIL, B.: Spät replizierendes X-Chromosom und Sexchromatinhäufigkeit beim Menschen
Humangenetik 9, 64-74 (1970)

HEITZ, E.: Über totale und partielle somatische Heteropyknose,sowie strukturelle Geschlechtschromosomen bei Drosophila funebris
Z. Zellforsch. 19, 720-742 (1933)

HEITZ, E.: Die somatische Heteropyknose bei Drosophila melanogaster und ihre genetische Bedeutung
Z. Zellforsch. 20, 237-387 (1934)

HENKING, H.: Untersuchungen über die ersten Entwicklungsvorgänge in den Eiern der Insekten.III Spezielles und Allgemeines
Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 54 (1892)

ISSA, M., Blank, C.E., Atherton, G.W.: The temporal appearance of sex chromatin and of the late-replicating X-chromosome in the blastocyst of the domestic rabbit
Cytogenetics 8, 219-237 (1969)

JAMES, J.: Observations on the so-called sex chromatin
Z. Zellforsch. 51, 597 (1960)

KAILIN, E.W., PLATT, L.J.: Comparison of X-chromatin frquency in buccal and vaginal cells from atopic women
Acta Cytol. 15, 3, 294-296 (1971)

KATZ, M.M., WRIGHT, S.W.: The use of hair root sheat for X chromatin determination
J. Pediat. (St. Louis) 76, 2, 292-295 (1970)

KLINGER, H.P., LUDWIG, K.S.: A universal stain for the sex chromatin body
Stain Technol. 32, 235-244 (1957 a)

KLINGER, H.P.: The fine structure of the sex chromatin body
Exp. Cell Res. 14, 207-211 (1957 b)

KLINGER, H.P., Schwarzacher, H.G., Weiss, J.: DNA content and size of sex chromatin positive and negative nuclei during the cell cycle
Cytogenetics 6, 1-19 (1967)

KLINGER, H.P., Davis, J., Goldhuber, P., Ditta, T.: Factor influencing mammalian X-chromosome condensation and sex chromatin formation. I.The effect of in cell density on sex chromatin frequency Cytogenetics 7, 39-57 (1968)

KOCH, F.: The occurrence of sex chromatin in testicular tumors Act. Path. et Microbiol. (Scand.) 212 (1970)

LEE, J.C., YUNIS, J.J.: A developmental study of constitutive heterochromatin in Microtus agrestis Chromosoma 32, 237 (1971)

LIMA DE FARIA, A.: Differential uptake of tritiated thymidine in hetero- and euchromatin in Melanoplus and Secale J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 457-466 (1959)

LIMA DE FARIA, A., Reitalu, I., O'Sullivan, M.A.: Replication of autosomal heterochromatin in man Chromosoma (Berl.) 16, 152-161 (1965)

LYON, M.F.: Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus) Nature (Lond.) 190, 372-373 (1961)

LYON, M.F.: Chromosomal and subchromosomal inactivation
Ann. Rev. Genet. 2, 31-52 (1968)

LYON, M.F.: Genetic activity of sex chromosomes in somatic cells of mammals
Phil. Trans Roy. Soc. Lond. B. 259, 41-52 (1970)

LYON, M.F.: Possible mechanisms of X-chromosome inactivation
Nature New Biol. 232, 229-232 (1971)

LYON, M.F.: X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals
Biol. Rev. 47, 1-35 (1972)

MAJEWSKI, F., Bier, L., Pfeiffer, R.A.: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des menschlichen Y-Chromosoms in Interphasekernen durch Acridinderivate ("Atebrin", "Acranil")
Klin. Wschr. 49,814-818 (1971)

MARBERGER, E., Boccabella, R.A., Nelson, W.O.: Oral smear as a method of chromosomal sex detection
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 89, 488 (1965)

MCCLUNG, C.E.: Notes on the accessory chromosome
Anat. Anz. 20, 22o-226 (1901)

MCCLUNG, C.E.: The accessory chromosome - sex determinant ?
Biol. Bull. 3, 43-84 (1902)

MENDE, S., ALONSO, A.: Bestimmung des männlichen Kerngeschlechts in menschlichen Blutzellen
Dtsch. med. Wschr. 96, 1122-1127 (1971)

MILES, C.P.: Peripheral position of sex chromatin
Nature (Lond.) 191,626-627 (1961)

MITTWOCH, U.: Barr bodies and nuclear size in cultured human fibroblasts
Nature (Lond.) 198, 975-977 (1963)

MITTWOCH, U.: Barr bodies in relation to DNA values and nuclear size in cultured human fibroblasts
Cytogenetics 6, 38-50 (1967)

MONESI, V.: DNA, RNA and protein synthesis during the mitotic cell cycle
In : "Handbook of Molecular Cytology" A. Lima-de-Faria, ed. North Holland, Amsterdam, 472-499 (1969)

MOORE, K.L., BARR, M.L.: Nuclear morphology, according to sex, in human tissues
Acta Anat. (Basel) 21, 197-208 (1954)

MOORE, K.L., BARR, M.L.: Smears from oral mucosa in the detection of chromosomal sex Lancet 1955 II, 1957

MORISHIMA, A., Grumbach, M.M., Taylor, J.H.: Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex-chromatin Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 756-763 (1962)

MÜLLER, H.J., SETTLES, F.: The non-functioning of the genes in spermatozoa Z. Abstam. Vererb. 43, 285-312 (1926)

MÜLLER, H.J., PAINTER, T.S.: The differentiation of the sex chromosomes of drosophila into genetically active and inert regions Zeit. f. Abst. u. Vererbungsl. 62, 316 (1932)

MUKHERJEE, A.B., Moser, G.C., Nitowsky, H.M.: Quinacrine mustard fluorescence in human amniotic fluid cell cultures Nature (Lond.) 235, 226-229 (1972)

OHNO, S., Kaplan, W.D., Kinosita, R.: Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of Rattus novegicus Exp. Cell Res. 18, 415-418 (1959)

OHNO, S., MAKINO, S.: The single-X nature of sex chromatin in man Lancet 1961 I, 78-79

PARK, W.W.: The occurrence of sex chromatin in early human and macaque embryos
J. Anat. (Lond.) 91, 369-373 (1957)

PEARSON, P.L.: A fluorescent technique for identifying human chromatin in a variety of tissues
Bull. Europ. Soc. hum. Genet. 4, 35-38 (1970)

PEARSON, P.L., Bobrow, M., Vosa, C.G.: Technique for identifying Y-chromosomes in human interphase nuclei
Nature (Lond.) 226, 78-80 (1970)

PEARSON, P.L., Bobrow, M., Vosa, C.G., Barlow, P.W.: Quinacrine fluorescence in mammalian chromosomes
Nature (Lond.) 231, 326-329 (1971)

POLANI, P.E., MUTTON, D.E.: Y-fluorescence of interphase nuclei, especially circulating lymphocytes
Brit. med. J. 1, 138-142 (1971)

ROOK, A., Hsu, L.Y., Gertner, M., Hirschhorn, K.: Identification of X and Y chromosomes in amniotic fluid cells
Nature (Lond.) 230, 53 (1971)

RUSSELL, L.B.: Mammalian X-chromosome action: Inactivation limited in spread and in region of origin Science 140, 976 (1963)

SANDRITTER, W.: Funktionsstrukturen des Zellkerns. Eu- und Heterochromatin Med. Welt 1, 1-10 (1970)

SCHIFFER, L.M.: Acridinorange as a chromosome stain Lancet 1961 II, 1362

SCHMID, W.: DNA replication patterns of human chromosomes Cytogenetics 2, 175-193 (1963)

SCHMID, W.: Sex chromatin in hair roots Cytogenetics 6, 342-349 (1967)

SCHNEDL, W.: Untersuchungen über das Sexchromatin in menschlichen Fibroblastenkulturen Acta Anat. (Basel) 57, 52-65 (1964)

SCHNEDL, W.: Sexchromatin und Kerngröße im Zellzyklus Chromosoma (Berl.) 27, 421-435 (1969)

SCHWARZACHER, H.G.: Sex chromatin in living human cells in vitro Cytogenetics 2, 117-128 (1963)

SCHWARZACHER, H.G., SCHNEDL, W.: Zur Ultrastruktur der Chromosomen des Menschen Humangenetik 8, 75-80 (1969)

SCHWARZACHER, H.G., PERA, F.: Das Problem der sexchromatinnegativen Zellen Z. Anat. Entwicklungsgesch. 132, 18-33 (1970)

SCHWINGER, E.,Rakebrand, E., Müller, H.J., Bühler, E.M., Tettenborn, U.; Y-body in hair roots Humangenetik 12, 79-80 (1971)

SCHWINGER, E.: Cytogenetische Querschnittsuntersuchungen an straffällig gewordenen Personen und vergleichbaren Kontrollgruppen In:Festschrift zum 65. Geburtstag von Prof. Dr. med Walter Krauland FU Berlin. Herausgeber V.Schneider Berlin 61-73 (1977)

SPERLING, H., SCHWINGER, E.: Barr-Körperchen in Haarwurzelzellkernen nach Fluoreszenz- und Diamantfuchsin-Färbung Humangenetik 18, 181-182 (1973)

SPERLING, K.: Cytogenetic studies from the hair-root Lancet 1971 I, 753-754

STEVENS, N.M.: Studies in spermatogenesis with especial reference to the accessory chromosome Carnegie Inst. Wash. Publ. 36, 1-32 (1905)

STEVENS, N.M.: Studies in spermatogenesis II. A comparative study of the heterochromosomes in certain species coleoptera, hemiptera and lepidoptera,with especial reference to sex determination Carnegie Inst. Wash. Publ. 36, 33-74 (1906)

STRUGGER, S.: Die Vitalfluorochromierung der Chromosomen Dtsch. tierärztl. Wschr. 47, 645 (1940)

TAYLOR, J.H.: Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of chinese hamster J. biophys. biochem. Cytol. 7, 455-464 (1960)

THERKELSEN, A.J., LAMM, L.U.: Difference in the frequency of sex chromatin positive cells in DNA-synthesizing and non-synthesizing human cells in tissue cultures Exp. Cell Res. 41,215 (1966)

THERKELSEN, A.J., PETERSEN, G.B.: Frequency of "Y-chromatin body" in human skin fibroblast in tissue culture and its relation to groth phase Exp. Cell Res. 65, 473-475 (1971)

THULINE, H.C.: Y-specific fluorescence in peripheral blood leucocytes J. of Pediat. 78, 5, 875-876 (1971)

VOSA, L.G.: Heterochromatin recognition with fluochromes Chromosoma (Berl.) 30, 366-372 (1970)

WALKER, S., Gregson, N.M., Hibbard, B.M.: Nuclear sex and antenatal diagnosis of Klinefelter's syndrome Lancet 1971 II, 430

WILSON, E.B.: Studies on the chromosomes I. The behaviour of the idiochromosomes in hemiptera J. Exp. Zool. 2, 371-405 (1905)

WILSON, E.B.: Studies on chromosomes The "accessory" chromosome in Syromastes and Pyrrhocoris with a comparative review of the type of sexual differences of the chromosome group J. Exp. Zool. 6, 69-99 (1909)

WILSON,E.B.: The sex chromosomes
Arch. Mikrosk. Anat. Entwicklungsmech. 77 II, 249-271 (1911)

ZECH, L. : Investigation of metaphase chromosomes with DNA-binding fluorochromes
Exp. Cell Res. 58, 463 (1969)

7 Lebenslauf

Am 21.4. 1942 wurde ich als Sohn des Ministerialrates i.R. Friedrich Sperling und seiner Ehefrau Ursula,geb.Reich in Leer/Ostfrsl. geboren.Besuch der Volksschule in Leer und Oppenheim,Gymnasium in Oppenheim,Koblenz,Emden und Düsseldorf.Zwischen 1962 und 1964 freiwilliger Zeitsoldat bei der Bundeswehr.1968 bestand ich am Abendgymnasium St.Georg in Hamburg das Abitur.Seit dem Sommersemester 1968 studierte ich in Bonn Medizin,bestand dort 1971 das Physikum und am 11.7.1974 das Medizinische Staatsexamen.Am 2.2.1976 approbierte ich zum Arzt.Danach war ich als Assistent bis Okt. 1977 in der Anästhesie und der Chirurgie des St. Marien Hospitals in Bonn tätig.Seit dem Herbst 1977 arbeite ich an der Internistischen Abteilung des Herz-Jesu Hospitals in Bonn.Mein Berufsziel ist der Arzt für Allgemeinmedizin.

Herrn Professor Dr. med. E. Schwinger möchte ich für die Überlassung des Themas und die mir bei der Fertigstellung der Arbeit gewährte Hilfe meinen herzlichen Dank aussprechen.

Frau A. Haase gilt mein Dank für die unermüdliche Mithilfe bei der Erstellung der Photographien.